

ANTICUERPOS ANTI-TRANSTIRETINA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica los beneficios de 35 USC 119(e) de la Solicitud Provisional U.S. N° 62/569.436 presentada el 6 de octubre de 2017, y de la Solicitud Provisional US N° 62/598.965, presentada el 14 de diciembre de 2017, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad a todos los efectos.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] El Listado de Secuencias incluido en el archivo 516711SEQLST.txt es 59,6 kilobytes, fue creado el 20 de septiembre de 2018 y está incorporado a la presente como referencia.

ANTECEDENTES

[0003] Se cree que muchas enfermedades son causadas por plegamiento anormal y agregación de proteínas específicas de la enfermedad. Estas proteínas pueden acumularse en acumulaciones de diagnóstico patológico, conocidas como amiloides, que se visualizan mediante determinadas tinciones histológicas. Se cree que los amiloides provocan respuestas inflamatorias y poseen múltiples consecuencias negativas para los tejidos involucrados. Además, pueden existir agregados más pequeños de proteínas anormalmente plegadas y ejercer efectos citotóxicos.

[0004] La transtiretina (TTR) es una de las muchas proteínas que se sabe que se pliegan mal y se agregan (es decir, experimentan amiloidogénesis). La amiloidosis mediada por transtiretina (ATTR) abarca dos formas de la enfermedad: enfermedad familiar proveniente del mal plegamiento de una TTR mutada o de una variante de TTR, y una esporádica, enfermedad no genética causada por el mal plegamiento y agregación de la TTR salvaje (*wild-type*). El proceso de amiloidogénesis de TTR puede causar patología en el sistema nervioso y/o en el corazón, al igual que en otros tejidos.

BREVE DESCRPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0005] En un aspecto, la invención provee un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a la TTR mal plegada y no a la forma nativa de la proteína. Los ejemplos de dichos anticuerpos se unen a un epítipo dentro de los residuos aminoácidos 101-109 de la región madura de la SEQ ID NO:26.

[0006] Algunos de dichos anticuerpos compiten por la unión a la proteína TTR humana mal plegada con el anticuerpo 18C5. Algunos de dichos anticuerpos se unen al mismo epítipo en la transtiretina humana que el 18C5.

[0007] Algunos de dichos anticuerpos comprenden tres CDRs de cadena liviana y tres CDRs de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 18C5, en el que 18C5 es un anticuerpo de ratón caracterizado por una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:81 y una región variable de cadena liviana madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO:87.

[0008] Algunos de dichos anticuerpos comprenden las tres CDRs de cadena pesada como fue definido por la combinación de Kabat/Chothia (*Kabat/Chothia Composite*) (SEQ ID NOs: 5, 7, y 9) y las tres CDRs de cadena liviana como fue definido por Kabat/Chothia Composite (SEQ ID NOs: 11, 13, y 15).

[0009] Algunos de dichos anticuerpos son 18C5 o una forma quimérica, revestida, o humanizada del mismo. Algunos de dichos anticuerpos se unen a un epítipo en las posiciones 101-109 en la región madura de la SEQ ID NO:26. Algunos de dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Algunos de dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos, humanizados, revestidos (*veneered antibody*) o humanos. En algunos de dichos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene $\geq 85\%$ de identidad con la secuencia humana. En algunos de dichos anticuerpos, la región variable de cadena liviana madura tiene $\geq 85\%$ de identidad con la secuencia humana. En algunos de dichos anticuerpos, cada una de las regiones variables de cadena pesada y de cadena liviana maduras tiene $\geq 85\%$ de identidad con la secuencia de línea germinal humana.

Algunos de dichos anticuerpos son anticuerpos humanizados. Algunos de dichos anticuerpos poseen un isotipo de IgG1 humana. Algunos de dichos anticuerpos poseen un isotipo de IgG2 o IgG4 humana.

[0010] Algunos de dichos anticuerpos son anticuerpos 18C5 humanizados o quiméricos que se unen específicamente a transtiretina, donde 18C5 es un anticuerpo de ratón caracterizado por una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO:81 y una región variable de cadena liviana madura de SEQ ID NO:87. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de cadena pesada de 18C5 y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de cadena liviana de 18C5.

[0011] En algunos anticuerpos, las CDRs son de una definición seleccionada del grupo de Kabat, Chothia, Kabat/Chothia Composite, AbM y Contact. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de cadena pesada de Kabat/Chothia Composite de 18C5 (SEQ ID NOs: 5, 7, y 9) y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de cadena liviana de Kabat/Chothia Composite de 18C5 (SEQ ID NOs: 11, 13, y 15). En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena pesada de Kabat de 18C5 (SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:9) y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena liviana de Kabat de 18C5 (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:15). En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena pesada de Chothia de 18C5 (SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, y SEQ ID NO:9) y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena liviana de Chothia de 18C5 (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:15). En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena pesada de AbM de 18C5 (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, y SEQ ID NO:9) y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena liviana de AbM de 18C5 (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO:15). En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena pesada de Contact de 18C5 (SEQ ID NOs 100-102) y la región variable de cadena liviana madura humanizada comprende las tres CDRs de la cadena liviana de Contact de 18C5 (SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:98, y SEQ ID NO:99).

[0012] Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs:85-86 y una región variable de cadena liviana madura humanizada que

tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 91-92.

[0013] En algunos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido como se especifica: H37 está ocupada por V o A, H45 está ocupada por L o Q, H47 está ocupada por L o W, H48 está ocupada por L o I, H49 está ocupada por A o G, and H94 está ocupada por S o R. En algunos anticuerpos, las posiciones H37, H45, H47, H48, H49, y H94 en la región VH están ocupadas por A, Q, W, I, G, y R, respectivamente.

[0014] En algunos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido como se especifica: L2 está ocupada por I o V y L45 está ocupada por Q o R. En algunos anticuerpos, las posiciones L2 y L45 en la región VL están ocupadas por V y R, respectivamente.

[0015] Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 85-86 y una región variable de cadena liviana madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 91-92. Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 85-86 y una región variable de cadena liviana madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 91-92.

[0016] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 85-86 y la región variable de cadena liviana madura tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 91-92.

[0017] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85 y la región variable de cadena liviana madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:85 y la región variable de cadena liviana madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y la región variable de cadena liviana madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:91. En algunos anticuerpos, la región variable de

cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:86 y la región variable de cadena liviana madura tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:92.

[0018] En algunos anticuerpos, el anticuerpo es un anticuerpo intacto. En algunos anticuerpos, el anticuerpo es un fragmento de unión. En algunos de dichos anticuerpos, el fragmento de unión es un anticuerpo simple cadena, Fab, o un fragmento de Fab'2.

[0019] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena liviana madura está fusionada a una región constante de cadena liviana y la región variable de cadena pesada madura esta fusionada a una región constante de cadena pesada. En algunos de dichos anticuerpos, la región constante de cadena pesada es una forma mutante de una región constante de cadena pesada humana natural que tiene unión reducida a un receptor Fcγ en relación a la región constante de cadena pesada humana natural. En algunos de dichos anticuerpos, la región constante de cadena pesada es de isotipo IgG1. En algunos de dichos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura está fusionada a una región constante de cadena pesada que posee la secuencia de SEQ ID NO:22 y/o la región variable de cadena liviana madura esta fusionada a una región constante de cadena liviana que tiene la secuencia de SEQ ID NO:24.

[0020] En otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, un segundo anticuerpo que se une a un epítipo diferente de TTR de aquel unido por 18C5, y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas de dichas composiciones farmacéuticas, el segundo anticuerpo es 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, o una versión quimérica o humanizada de los mismos. En algunas de dichas composiciones farmacéuticas, el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se une en los residuos 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, o 115-127 de TTR.

[0021] En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo biespecífico que comprende dos regiones de unión a antígeno, un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente dentro de 101-109 de TTR y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a otra región de TTR. En algunos de dichos anticuerpos biespecíficos, el segundo dominio de unión a antígeno es un dominio de unión a antígeno de 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, o una versión quimérica o humanizada de los mismos.

En algunos de dichos anticuerpos biespecíficos, el segundo dominio de unión a antígeno se une a los residuos 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, o 115-127 de TTR.

[0022] En otro aspecto, la invención provee una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0023] En otro aspecto, la invención provee un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la cadena liviana de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente. En otro aspecto, la invención provee un vector de expresión recombinante que comprende dicho ácido nucleico. En otro aspecto, la invención provee células hospedadoras transformadas con dicho vector de expresión recombinante.

[0024] En otro aspecto, la invención provee un método de humanización de un anticuerpo, comprendiendo el método:

- (a) seleccionar un anticuerpo aceptor humano;
 - (b) identificar los residuos de aminoácidos del anticuerpo de ratón que se retendrán;
 - (c) sintetizar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende las CDRs de la cadena pesada del anticuerpo de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena liviana humanizada que comprende las CDRs de la cadena liviana del anticuerpo de ratón; y
 - (d) expresar los ácidos nucleicos en una célula hospedadora para producir un anticuerpo humanizado;
- en donde el anticuerpo de ratón comprende una región variable de cadena pesada madura que posee una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:81 y una región variable de cadena liviana madura que posee una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87.

[0025] En otro aspecto, la invención provee un método para producir un anticuerpo humanizado, quimérico, o revestido, comprendiendo el método:

(a) cultivar células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, para que las células secreten el anticuerpo; y

(b) purificar el anticuerpo a partir del medio de cultivo celular; en donde el anticuerpo es una forma humanizada, quimérica, o revestida de 18C5.

[0026] En otro aspecto, la invención provee un método de producción de una línea celular que produce un anticuerpo humanizado, quimérico, o revestido, comprendiendo el método:

(a) introducir un vector que codifica las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo y un marcador seleccionable dentro de las células;

(b) propagar las células bajo condiciones para seleccionar células que hayan aumentado el número de copias del vector;

(c) aislar células únicas de las células seleccionadas; y

(d) depositar en bando las células clonadas a partir de una célula única seleccionada en base al rendimiento del anticuerpo; en donde el anticuerpo es una forma humanizada, quimérica, o revestida de 18C5.

[0027] Algunos de dichos métodos también comprenden la propagación de las células bajo condiciones selectivas y el relevamiento de líneas celulares que naturalmente expresan y secretan al menos 100 mg/L/10⁶ células/24h.

[0028] En otro aspecto, la invención provee un método para inhibir o reducir la agregación de transtiretina en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por transtiretina, que comprende administrar al sujeto un régimen efectivo de cualquiera de los anticuerpos novedosos mencionados anteriormente, inhibiendo o reduciendo de esta manera la agregación de transtiretina en el sujeto.

[0029] En otro aspecto, la invención provee un método de inhibición o reducción de la formación de transtiretina fibrilar en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por transtiretina, que comprende administrar al sujeto un régimen efectivo de cualquiera de los anticuerpos novedosos mencionados anteriormente, inhibiendo o reduciendo de esta manera la formación de transtiretina fibrilar en el sujeto.

[0030] En otro aspecto, la invención provee un método de reducción de depósitos y agregados de transtiretina en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por transtiretina, que comprende la administración al sujeto de un régimen efectivo de

cualquiera de los anticuerpos novedosos mencionados anteriormente, reduciendo de esta manera los depósitos de transtiretina en el sujeto.

[0031] En otro aspecto, la invención provee un método de eliminación (*clearing*) de amiloide de transtiretina en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por transtiretina, que comprende la administración al sujeto de un régimen efectivo de cualquiera de los anticuerpos novedosos mencionados anteriormente, eliminando de ese modo el amiloide de transtiretina del sujeto en relación con un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por transtiretina que no ha recibido el anticuerpo.

[0032] En otro aspecto, la invención provee un método para tratar o efectuar profilaxis de una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un régimen efectivo de cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente.

[0033] En otro aspecto, la invención provee un método de retraso del inicio de una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un régimen efectivo de cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente.

[0034] En algunos de dichos métodos, la amiloidosis mediada por transtiretina está asociada con una condición seleccionada de cualquiera de miocardiopatía o hipertrofia, polineuropatía familiar amiloide, amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA), amiloidosis senil sistémica, amiloidosis senil cardíaca, estenosis espinal, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, degeneración macular relacionada con la edad, y un trastorno de ligamentos o tendones.

[0035] En otro aspecto, la invención provee un método de tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de cualquiera de miocardiopatía o hipertrofia, polineuropatía familiar amiloide, amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA), amiloidosis senil sistémica, amiloidosis senil cardíaca, estenosis espinal, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, degeneración macular relacionada con la edad, y un trastorno de ligamentos o tendones, comprendiendo el método administrar al sujeto un régimen efectivo del anticuerpo de cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente.

[0036] En algunos de dichos métodos, el anticuerpo es administrado en combinación con un segundo anticuerpo que se une a un epítipo diferente de TTR de aquél al cual se une 18C5. En algunos de dichos métodos, el segundo anticuerpo es 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24,

NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, o una forma quimérica o humanizada de los mismos. En algunos de dichos métodos, el segundo anticuerpo se une dentro de los residuos 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, o 115-127 de TTR.

[0037] En otro aspecto, el anticuerpo es administrado como una monoterapia.

[0038] En otro aspecto, la invención provee un método para diagnosticar una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto con una cantidad efectiva de cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente. Algunos de dichos métodos comprenden además poner en contacto la muestra biológica del sujeto con una cantidad efectiva de un segundo anticuerpo que se une a un epítipo diferente de TTR que aquél al cual se une 18C5. En alguno de dichos métodos, el segundo anticuerpo es 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, o una forma quimérica o humanizada de los mismos. En alguno de dichos métodos, el segundo anticuerpo se une dentro de los residuos 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, o 115-127 de TTR.

[0039] Algunos de dichos métodos además comprenden detectar la unión del anticuerpo a transtiretina, en el que la presencia del anticuerpo unido indica que el sujeto tiene una amiloidosis mediada por transtiretina.

[0040] Algunos de dichos métodos comprenden además comparar la unión del anticuerpo a la muestra biológica con la unión del anticuerpo a una muestra control, en donde la unión incrementada del anticuerpo a la muestra biológica con respecto a la muestra control indica que el sujeto tiene una amiloidosis mediada por transtiretina.

[0041] En algunos de dichos métodos, la muestra biológica y la muestra control comprenden células del mismo origen tisular. En algunos de dichos métodos, la muestra biológica y/o la muestra control es sangre, suero, plasma, o tejido sólido. En algunos de dichos métodos, el tejido sólido es del corazón, sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo, riñones, ojos, grasa abdominal, o tracto gastrointestinal.

[0042] En algunos de dichos métodos, la amiloidosis mediada por transtiretina es una amiloidosis por transtiretina familiar o una amiloidosis por transtiretina esporádica. En algunos de dichos métodos, la amiloidosis por transtiretina familiar es una miocardiopatía amiloide familiar (FAC), polineuropatía amiloide familiar (FAP), o amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA). En algunos de dichos métodos, la amiloidosis por transtiretina esporádica es amiloidosis senil sistémica (SSA) o amiloidosis senil cardíaca (SCA).

[0043] En algunos de dichos métodos, la amiloidosis mediada por transtiretina está asociada con acumulación amiloide en el corazón, sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo, riñones, ojos, grasa abdominal, o tracto gastrointestinal del sujeto.

[0044] En otro aspecto, la invención provee un método para detectar la presencia o ausencia de depósitos de transtiretina en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra biológica del sujeto del que se sospecha comprende acumulación amiloide con una cantidad efectiva de cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente.

[0045] Algunos de dichos métodos comprenden además detectar la unión del anticuerpo a transtiretina, en donde la detección del anticuerpo unido indica la presencia de depósitos de transtiretina.

[0046] Algunos de dichos métodos comprenden además comparar la unión del anticuerpo a la muestra biológica con la unión del anticuerpo a una muestra control, en donde una unión incrementada del anticuerpo a la muestra biológica con respecto a la muestra control indica que el sujeto tiene una amiloidosis mediada por transtiretina.

[0047] En algunos de dichos métodos, la muestra biológica y la muestra control comprenden células del mismo origen tisular. En algunos de dichos métodos, la muestra biológica y/o la muestra control es sangre, suero, plasma, o tejido sólido. En algunos de dichos métodos, el tejido sólido es de corazón, sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo, riñones, ojos, grasa abdominal, o tracto gastrointestinal.

[0048] En otro aspecto, la invención provee un método para determinar un nivel de depósitos de transtiretina en un sujeto, que comprende administrar cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente y detectar la presencia de anticuerpo unido en el sujeto. En algunos de dichos métodos, la presencia de anticuerpo unido está determinada por tomografía por emisión de positrones (PET).

[0049] En otro aspecto, la invención provee un método para tratar o efectuar profilaxis de una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto, que comprende administrar un régimen efectivo de un estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico basado en un oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico basado en un ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico, en el cual el sujeto ha sido previamente tratado con cualquiera de los novedosos anticuerpos mencionados anteriormente. En algunos de dichos métodos, el sujeto ya no recibe tratamiento con el anticuerpo. En algunos de dichos métodos, el estabilizador del tetrámero de TTR es tafamidis o diflunisal. En algunos de dichos métodos, el agente terapéutico basado en oligonucleótido antisentido es inotersén. En algunos de dichos métodos el agente terapéutico basado en ARNi es patisiran o revusiran.

[0050] En algunos métodos, el anticuerpo es administrado en combinación con un estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico basado en oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico basado en ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico. En algunos de dichos métodos, el estabilizador del tetrámero de TTR es tafamidis o diflunisal. En algunos de dichos métodos, el agente terapéutico basado en oligonucleótido antisentido es inotersén. En algunos de dichos métodos, el agente terapéutico basado en ARNi es patisiran o revusiran.

[0051] En algunos métodos, el anticuerpo es administrado concomitantemente con un estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico basado en oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico basado en ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico. En algunos de dichos métodos, el estabilizador del tetrámero de TTR es tafamidis o diflunisal. En algunos de dichos métodos, el estabilizador del tetrámero de TTR es diflunisal. En algunos de dichos métodos, el agente terapéutico basado en oligonucleótido antisentido es inotersén. En algunos de dichos métodos, el agente terapéutico basado en ARNi es patisiran o revusiran.

[0052] En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR, que comprende: (a) inmunizar un animal con TTR o un fragmento del mismo; y (b) relevar los anticuerpos inducidos para identificar una unión a anticuerpo dentro de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, la inmunización es realizada con un fragmento de no más de 25 residuos contiguos de TTR incluyendo al menos 3 residuos contiguos dentro de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, el fragmento consiste en los residuos 101-109 de TTR, opcionalmente unido a un

portador. En algunos métodos, el relevamiento es realizado por determinación de unión de anticuerpos a un fragmento de TTR que consiste en los residuos 101-109 de TTR.

[0053] En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un anticuerpo que se une a un epítotope dentro de los residuos 101-109 de TTR: que comprende: proveer una biblioteca de presentación de anticuerpos; y relevar la biblioteca de presentación para identificar una unión de anticuerpo dentro de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, la biblioteca de presentación muestra anticuerpos como fragmentos Fv. En algunos métodos, la biblioteca de presentación es una biblioteca de presentación *naïve*. En algunos métodos, la biblioteca de presentación es producida mediante inmunización de un roedor con TTR o un fragmento del mismo y clonando ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana de anticuerpos dentro de un vector de presentación. En algunos métodos, el relevamiento es realizado determinando la unión de los miembros de la biblioteca a un fragmento de TTR que consiste en los residuos 101-109. En algunos métodos, el relevamiento es realizado determinando la unión de los miembros de la biblioteca a TTR en presencia de un anticuerpo de referencia, que se une a un epítotope dentro de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, el anticuerpo de referencia es 18C5.

[0054] En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un anticuerpo que compite por la unión con el anticuerpo 18C5 para unirse a TTR, que comprende poner en contacto TTR con el anticuerpo en presencia y ausencia del anticuerpo 18C5 y determinar la unión del anticuerpo a TTR, en donde una unión reducida en presencia del anticuerpo 18C5 indica que el anticuerpo compite con el anticuerpo 18C5 para unirse a TTR.

[0055] En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un anticuerpo que se une al mismo epítotope que el anticuerpo 18C5 en TTR, que comprende: (a) determinar el epítotope al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR; (b) inmunizar un animal con TTR o un fragmento del mismo; y (c) relevar los anticuerpos inducidos para identificar una unión de anticuerpo al mismo epítotope que el anticuerpo 18C5. En algunos métodos, el epítotope al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR es determinado por mutagénesis de TTR. En algunos métodos, el epítotope al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR es determinado por cristalografía de rayos X.

[0056] En otro aspecto, la invención provee un método para identificar un anticuerpo que se une al mismo epítotope que el anticuerpo 18C5 en TTR, que comprende: (a) determinar el

epítoto al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR; (b) proveer una biblioteca de presentación de anticuerpos; y (c) relevar la biblioteca de presentación para identificar una unión de anticuerpo al mismo epítoto que el anticuerpo 18C5. En algunos métodos, el epítoto al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR es determinado por mutagénesis de TTR. En algunos métodos, el epítoto al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR es determinado por cristalografía de rayos X. En algunos métodos, la biblioteca de presentación muestra anticuerpos como fragmentos Fv. En algunos métodos, la biblioteca de presentación es una biblioteca de presentación *naïve*. En algunos métodos, la biblioteca de presentación es producida mediante la inmunización de un roedor con TTR o un fragmento del mismo y clonando ácidos nucleicos que codifican las cadenas liviana y pesada de anticuerpos dentro de un vector de presentación. En algunos métodos, el relevamiento es realizado mediante la determinación de la unión de miembros de la biblioteca a un fragmento de TTR que consiste en los residuos 101-109. En algunos métodos, el relevamiento es realizado mediante la determinación de la unión de miembros de la biblioteca a TTR en presencia de un anticuerpo de referencia, que se une a un epítoto dentro de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, el anticuerpo de referencia es 18C5. En algunos métodos, cada miembro de la biblioteca de presentación muestra la misma región variable de cadena liviana y una región variable de cadena pesada diferente. En algunos métodos, la región variable de cadena liviana es la región variable de cadena liviana del anticuerpo 18C5. En algunos métodos, la región variable de cadena pesada es obtenida de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humana reordenadas. En algunos métodos, cada miembro de la biblioteca de presentación muestra la misma región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana diferente. En algunos métodos, la región variable de cadena pesada es la región variable de cadena pesada del anticuerpo 18C5. En algunos métodos, la región variable de cadena liviana es obtenida de una biblioteca de regiones variables de cadena liviana humana reordenadas.

[0057] En otro aspecto, la invención provee un método para tratar o efectuar la profilaxis de una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto que comprende administrar un inmunógeno que comprende un péptido TTR de hasta 20 aminoácidos contiguos de TTR al cual se une específicamente el anticuerpo 18C5, en donde el péptido, solo y/o cuando está unido a un portador heterólogo, induce la formación de anticuerpos que se unen específicamente a TTR en el sujeto.

[0058] En algunos métodos el inmunógeno comprende un epítipo al cual se une específicamente el anticuerpo 18C5. En algunos métodos, el inmunógeno comprende un péptido TTR de hasta 20 aminoácidos contiguos de los residuos 89-127 de TTR. En algunos métodos, el inmunógeno comprende un péptido TTR de hasta 11 aminoácidos contiguos de los residuos 100-110 de TTR. En algunos métodos, el inmunógeno comprende un péptido TTR de hasta 9 aminoácidos contiguos de los residuos 101-109 de TTR.

[0059] En algunos métodos, el epítipo del péptido TTR consiste de 4-11 aminoácidos contiguos de los residuos 89-127 de TTR. En algunos métodos, el epítipo del péptido TTR consiste de 4-11 aminoácidos contiguos de los residuos 100-110 de TTR. En algunos métodos, el epítipo del péptido TTR consiste en 4-9 aminoácidos contiguos de los residuos 101-109 de TTR.

[0060] En otro aspecto, la invención provee, un inmunógeno que comprende un péptido TTR de hasta 20 aminoácidos contiguos de los residuos 89-127 de TTR ligados a un portador heterólogo que ayuda a producir anticuerpos contra el péptido TTR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0061] La FIG. 1 representa los resultados de un experimento de Western blot que muestra que 18C5 posee una fuerte reactividad frente al monómero de TTR desnaturalizado, una reactividad menor frente al dímero desnaturalizado, y una reactividad muy débil frente a las especies de TTR nativas.

[0062] La FIG. 2 representa los resultados de un experimento de Western blot que muestra que un anticuerpo TTR comercial no pudo distinguir entre TTR nativa frente a desnaturalizada y mostró una reactividad muy fuerte hacia TTR nativa y desnaturalizada tanto monomérica como dimérica.

[0063] La FIG. 3 ilustra un alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada del anticuerpo 18C5 de ratón (SEQ ID NO:81), IGHV3-48*01 secuencia de línea germinal humana (SEQ ID NO:84), 5VZY-VH_huFrwk acceptor humano (Crenfab-VH) (SEQ ID NO:83) y versiones humanizadas del anticuerpo 18C5 (hu18C5_VH-v1 y hu18C5_VH-v2, SEQ ID NOs:

84 y 85, respectivamente). Las CDRs definidas de acuerdo con Kabat/Chothia Composite están en negrita en la secuencia de la región variable de cadena pesada de 18C5 de ratón.

[0064] La FIG. 4 ilustra un alineamiento de las regiones variables de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 de ratón (SEQ ID NO:87), IGKV2-30*02 secuencia línea germinal humana (SEQ ID NO:90), aceptor humano 5VZY-VL_huFrwk (Crenefab-VL) (SEQ ID NO:89) y versiones humanizadas del anticuerpo 18C5 (hu18C5-VL-v1 y hu18C5-VL-v2, SEQ ID NOs: 91 y 92, respectivamente). Las CDRs definidas de acuerdo con Kabat/Chothia Composite están en negrita en la secuencia de la región variable de la cadena liviana de 18C5 de ratón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0065] La SEQ ID NO:1 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18C5 de ratón con péptido señal.

[0066] La SEQ ID NO:2 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18C5 de ratón con péptido señal.

[0067] La SEQ ID NO:3 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 de ratón con péptido señal.

[0068] La SEQ ID NO:4 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 de ratón con péptido señal.

[0069] La SEQ ID NO:5 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H1 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0070] La SEQ ID NO:6 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H1 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0071] La SEQ ID NO:7 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0072] La SEQ ID NO:8 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H2 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0073] La SEQ ID NO:9 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0074] La SEQ ID NO:10 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H3 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0075] La SEQ ID NO:11 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L1 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0076] La SEQ ID NO:12 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L1 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0077] La SEQ ID NO:13 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0078] La SEQ ID NO:14 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L2 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0079] La SEQ ID NO:15 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0080] La SEQ ID NO:16 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L3 de Kabat/Chothia Composite del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0081] La SEQ ID NO:17 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de 18C5 quimérico (IgG1 humana).

[0082] La SEQ ID NO:18 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de 18C5 quimérico (IgG1 humana).

[0083] La SEQ ID NO:19 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana de 18C5 quimérico (kappa humana).

[0084] La SEQ ID NO:20 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana de 18C5 quimérico (kappa humana).

[0085] La SEQ ID NO:21 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 a modo de ejemplo.

[0086] La SEQ ID NO:22 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo.

[0087] La SEQ ID NO:23 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo.

[0088] La SEQ ID NO:24 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana a modo de ejemplo con Arginina N-terminal.

[0089] La SEQ ID NO:25 presenta la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana a modo de ejemplo sin Arginina N-terminal.

[0090] La SEQ ID NO:26 presenta la secuencia de aminoácidos de la transtiretina humana detallada en el número de acceso P02766.1 (UniProt).

[0091] La SEQ ID NO:27 presenta la secuencia de aminoácidos de la transtiretina humana detallada en el número de acceso AAB35639.1 (GenBank).

[0092] La SEQ ID NO:28 presenta la secuencia de aminoácidos de la transtiretina humana detallada en el número de acceso AAB35640.1 (GenBank).

[0093] La SEQ ID NO:29 presenta la secuencia de aminoácidos de la transtiretina humana detallada en el número de acceso y ABI63351.1 (GenBank).

[0094] La SEQ ID NO:30 presenta la secuencia de aminoácidos de los residuos 101-109 de la transtiretina humana.

[0095] La SEQ ID NO:31 presenta la secuencia de aminoácidos de los residuos 87-127 de la transtiretina humana.

[0096] La SEQ ID NO:32 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo.

[0097] La SEQ ID NO:33 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena liviana a modo de ejemplo con Arginina N-terminal.

[0098] La SEQ ID NO:34 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena liviana a modo de ejemplo sin Arginina N-terminal.

[0099] La SEQ ID NO:35 presenta la secuencia de aminoácidos de un péptido señal de la región constante de la cadena pesada.

[0100] La SEQ ID NO:36 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de la región constante de la cadena pesada.

[0101] La SEQ ID NO:37 presenta la secuencia de aminoácidos de un péptido señal de la región constante de la cadena liviana.

[0102] La SEQ ID NO:38 presenta una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de la región constante de la cadena liviana.

[0103] La SEQ ID NO:39 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0104] La SEQ ID NO: 40 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0105] La SEQ ID NO:41 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0106] La SEQ ID NO:42 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0107] La SEQ ID NO:43 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0108] La SEQ ID NO:44 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 de Kabat del anticuerpo 14G8.

[0109] La SEQ ID NO:45 presenta la secuencia de aminoácidos de un epítipo del anticuerpo 5A1.

[0110] La SEQ ID NO:46 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0111] La SEQ ID NO:47 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0112] La SEQ ID NO:48 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0113] La SEQ ID NO:49 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0114] La SEQ ID NO:50 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0115] La SEQ ID NO:51 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 de Kabat del anticuerpo 5A1.

[0116] La SEQ ID NO:52 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0117] La SEQ ID NO:53 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0118] La SEQ ID NO:54 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0119] La SEQ ID NO:55 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0120] La SEQ ID NO:56 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0121] La SEQ ID NO:57 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 de Kabat del anticuerpo 6C1.

[0122] La SEQ ID NO:58 presenta la secuencia de aminoácidos de una región VH del anticuerpo AD7F6.

[0123] La SEQ ID NO:59 presenta la secuencia de aminoácidos de una región VL del anticuerpo AD7F6.

[0124] La SEQ ID NO:60 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 del anticuerpo RT24.

[0125] La SEQ ID NO:61 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 del anticuerpo RT24.

[0126] La SEQ ID NO:62 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 del anticuerpo RT24.

[0127] La SEQ ID NO:63 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 del anticuerpo RT24.

[0128] La SEQ ID NO:64 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 del anticuerpo RT24.

[0129] La SEQ ID NO:65 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 del anticuerpo RT24.

[0130] La SEQ ID NO:66 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0131] La SEQ ID NO:67 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0132] La SEQ ID NO:68 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0133] La SEQ ID NO:69 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0134] La SEQ ID NO:70 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0135] La SEQ ID NO:71 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 del anticuerpo NI-301.35G11.

[0136] La SEQ ID NO:72 presenta la secuencia de aminoácidos de un epítipo de los anticuerpos MFD101, MDF102, MFD103, MFD105.

[0137] La SEQ ID NO:73 presenta la secuencia de aminoácidos de un epítoto de los anticuerpos MFD107, MFD108, MFD109, MFD111.

[0138] La SEQ ID NO:74 presenta la secuencia de aminoácidos de un epítoto del anticuerpo MFD114.

[0139] La SEQ ID NO:75 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0140] La SEQ ID NO:76 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0141] La SEQ ID NO:77 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0142] La SEQ ID NO:78 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0143] La SEQ ID NO:79 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0144] La SEQ ID NO:80 presenta la secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 de Kabat del anticuerpo 9D5.

[0145] La SEQ ID NO:81 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada madura del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0146] La SEQ ID NO:82 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo Abeta anti-piroglutamato murino Fab c#17, GenBank No. Acc. 1212215935.

[0147] La SEQ ID NO:83 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada de Crenezumab Fab humanizado (CreneFab) PDB: 5VZY, GenBank No. Acc. 1229749875.

[0148] La SEQ ID NO:84 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada de la IGHV3-48*01 de la secuencia de línea germinal humana, GenBank No. Acc. 1FN550289.1.

[0149] La SEQ ID NO:85 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VH_1.

[0150] La SEQ ID NO:86 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VH_2.

[0151] La SEQ ID NO:87 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana madura del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0152] La SEQ ID NO:88 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana del anticuerpo Abeta anti-piroglutamato Fab c#17, GenBank No. Acc. 1212215934.

[0153] La SEQ ID NO:89 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana de Fab Crenezumab humanizado (CreneFab) PDB: 5VZY, GenBank No. Acc. 1229749876.

[0154] La SEQ ID NO:90 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana de IGKV2-30*2 de la secuencia de línea germinal humana, GenBank No. Acc. CAA77315.

[0155] La SEQ ID NO:91 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VL_1.

[0156] La SEQ ID NO:92 presenta la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VL_2.

[0157] La SEQ ID NO:93 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Kabat del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0158] La SEQ ID NO:94 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Chothia del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0159] La SEQ ID NO:95 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0160] La SEQ ID NO:96 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 Chothia del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0161] La SEQ ID NO:97 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 AbM del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0162] La SEQ ID NO:98 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0163] La SEQ ID NO:99 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0164] La SEQ ID NO:100 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L1 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0165] La SEQ ID NO:101 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L2 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

[0166] La SEQ ID NO:102 presenta la secuencia de aminoácidos de CDR-L3 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón.

DEFINICIONES

[0167] Los anticuerpos monoclonales y otras entidades biológicas son típicamente proporcionadas en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo u otra entidad biológica es típicamente al menos 50% p/p puro en cuanto a proteínas interferentes y otros contaminantes provenientes de su producción o purificación pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal este combinado con un exceso de portador(es) farmacéuticamente aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. Algunas veces los anticuerpos monoclonales son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% p/p puro en cuanto a proteínas y contaminantes interferentes de la producción o purificación. Frecuentemente un anticuerpo monoclonal aislado u otra entidad biológica es la especie macromolecular predominante que queda luego de su purificación.

[0168] La unión específica de un anticuerpo a su antígeno diana significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es detectablemente mayor en magnitud y distinguible de la unión no específica que ocurre a al menos una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o un ajuste espacial particular (por ejemplo, del tipo llave y cerradura)

mientras que la unión no específica es usualmente el resultado de fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no implica necesariamente que un anticuerpo se une a una y sólo una diana.

[0169] La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “liviana” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento antigénico. Esta región variable es inicialmente expresada unida a un péptido señal clivable. La región variable sin el péptido señal a veces se denomina región variable madura. De este modo, por ejemplo, una región variable madura de cadena liviana significa una región variable de cadena liviana sin el péptido señal de cadena liviana. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

[0170] Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Ver en general, *Fundamental Immunology*, Paul, W., 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989, Cap. 7 (incorporado como referencia en su conjunto a todos los efectos).

[0171] Una región variable de la cadena liviana o pesada de inmunoglobulina (también denominada aquí “dominio variable de cadena liviana” (“dominio VL”) o “dominio variable de cadena pesada” (“dominio VH”), respectivamente) consiste en una región “marco” interrumpida por tres “regiones determinantes de complementariedad” o “CDRs.” Las regiones marco sirven para alinear las CDRs para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Las CDRs incluyen los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son los principales responsables de la unión antigénica. Desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, ambos dominios VL y VH comprenden los siguientes marcos (FR) y regiones CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Las CDRs 1, 2, y 3 de un dominio VL también se denominan aquí, respectivamente, como CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3; las CDRs 1, 2, y 3 de un dominio VH también se denominan aquí, respectivamente, como CDR-H1, CDR-H2, y CDR-H3.

[0172] La asignación de aminoácidos a cada dominio VL y VH está en acuerdo con cualquier definición convencional de CDRs. Las definiciones convencionales incluyen, la definición Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), la definición de Chothia (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883, 1989); una combinación (*Composite*) de Chothia Kabat CDR en el que CDR-H1 es una combinación de las CDRs de Chothia y Kabat; la definición AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular; y, la definición de contacto de Martin *et al* (bioinfo.org.uk/abs) (ver Tabla 1). Kabat provee una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas livianas se les asigna el mismo número. Cuando se dice que un anticuerpo comprende CDRs mediante una dada definición de CDRs (ejemplo, Kabat) esa definición especifica el número mínimo de residuos CDRs presentes en el anticuerpo (es decir, las CDRs de Kabat). No excluye que también estén presentes otros residuos que caen dentro de otra definición convencional de CDRs pero que están fuera de la definición especificada. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende CDRs definidas por Kabat incluye entre otras posibilidades, un anticuerpo en el que las CDRs contienen residuos de CDRs de Kabat y ningún otro residuos de CDRs, y un anticuerpo en el que la CDR H1 es una combinación de CDR H1 de Chothia-Kabat y otras CDRs contienen residuos CDRs de Kabat y sin residuos de CDRs adicionales basados en otras definiciones.

Tabla 1

Definiciones Convencionales de CDRs Usando Numeración Kabat

Bucle	Kabat	Chothia	Combinación de Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26-- H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*CDR-H1 por Chothia puede terminar en H32, H33, o H34 (dependiendo de la longitud del bucle). Esto se debe a que el esquema de la numeración Kabat posiciona inserciones de residuos extra en 35A y 35B, mientras que la numeración Chothia los posiciona en 31A y 31B. En el caso en que no estén presentes ni H35A ni H35B (numeración Kabat), el bucle CDR-H1 de Chothia termina en H32. Si solo está presente H35A, termina en H33. Si ambos H35A y H35B están presentes, termina en H34.

[0173] El término “anticuerpo” incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual derivan por la unión específica a la diana incluyendo cadenas pesadas separadas, cadenas livianas Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, Dabs, nanocuerpos, y Fv. Los fragmentos pueden ser producidos mediante técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término “anticuerpo” también incluye un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que posee dos pares de cadenas pesada/liviana diferentes y dos sitios de unión diferentes (ver, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares de cadenas pesada/liviana diferentes incluyen un par de cadena pesada/cadena liviana de 18C5 humanizado y un par de cadena pesada/cadena liviana específico para un epítipo diferente en la transtiretina que aquél al cual se une 18C5.

[0174] En algunos anticuerpos biespecíficos, un par cadena pesada/cadena liviana es un anticuerpo 18C5 humanizado como se describe más adelante y el otro par cadena pesada/cadena liviana es de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, como un receptor de insulina, un receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGF), un receptor de leptina, o un receptor de lipoproteína, o un receptor de transferrina (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). Dicho anticuerpo biespecífico puede ser transferido a través de la barrera hematoencefálica mediante transcitosis mediada por receptor. La captación cerebral del anticuerpo biespecífico puede potenciarse adicionalmente modificando mediante ingeniería el anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor dio por resultado una distribución más amplia en el cerebro (ver, por ejemplo, Atwal *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

[0175] Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplos también pueden ser: (1) un anticuerpo de doble dominio variable (DVD-Ig), donde cada cadena liviana y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem mediante un enlace peptídico corto (Wu *et al.*, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, En: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) un Tandab, que es la fusión de dos diacuerpos de cadena simple que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que posee dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (3) un flexicuerpo (*flexibody*), que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (4) una molécula denominada "*dock and lock*", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; o (5) una molécula denominada Scorpion, que comprende, por ejemplo, dos scFvs fusionados a ambos extremos de una región Fc humana. Los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos incluyen BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star), Fc-engineered IgG1 (Xencor) o DuoBody (basado en intercambio de brazo Fab, Genmab).

[0176] El término "epítope" se refiere a un sitio en un antígeno al cual se une un anticuerpo. Un epítope puede estar formado por aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegado terciario de una o más proteínas. Los epítopes formados por

aminoácidos contiguos (también conocidos como epítopes lineales) son retenidos típicamente con la exposición a solventes desnaturalizantes mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítopes conformacionales) se pierden típicamente en el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epítope típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopes incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). El epítope puede ser lineal, como un epítope de, por ejemplo, 2-5, 3-5, 3-9, o 5-9 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:26, que incluye, por ejemplo, dos o más aminoácidos contiguos dentro de los residuos 101-109 de la región madura de la SEQ ID NO:26. El epítope también puede ser un epítope conformacional que incluye, por ejemplo, dos o más segmentos no contiguos de aminoácidos dentro de los residuos 101-109 de la región madura de la SEQ ID NO:26. Si, por ejemplo, se dice que un anticuerpo se une a un epítope dentro de los residuos aminoácidos 101-109 de transtiretina (TTR) (la región madura de la SEQ ID NO:26), esto significa que el epítope está dentro del intervalo enumerado de aminoácidos incluyendo aquellos que definen los límites externos del intervalo. No significa necesariamente que todos los aminoácidos dentro del rango constituyan parte del epítope. Por tanto, por ejemplo, un epítope dentro de los residuos aminoácidos 101-109 de TTR puede consistir en los aminoácidos 101-109, 101-108, 102-109, 101-107, 102-108, 103-109, 101-106, 102-107, 103-108, 104-109, 101-105, 102-106, 103-107, 104-108, 105-109, 101-104, 102-105, 103-106, 104-107, 105-108, 106-109, 101-103, 102-104, 103-105, 104-106, 105-107, 106-108, 107-109, 101-102, 102-103, 103-104, 104-105, 105-106, 106-107, 107-108, o 108-109 de la SEQ ID NO:26, entre otros segmentos lineales de la SEQ ID NO:30, o en el caso de epítopes conformacionales, segmentos no contiguos de aminoácidos de la SEQ ID NO:30.

[0177] Los anticuerpos que reconocen el mismo o epítopes superpuestos pueden ser identificados en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir por la unión a un antígeno diana con otro anticuerpo. El epítope de un anticuerpo puede también ser definido por cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar los residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítope si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos poseen epítopes

superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de uno de los anticuerpos reducen o eliminan la unión del otro.

[0178] La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (ver, por ejemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Un anticuerpo de ensayo compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de ensayo (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos 50% como medida en un ensayo de unión competitiva. Algunos anticuerpos de ensayo inhiben la unión del anticuerpo de referencia en al menos 75%, 90% o 99%. Los anticuerpos identificados mediante ensayo de competencia (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente, suficientemente próximo al epítipo al cual se une el anticuerpo de referencia, para que se produzca el impedimento estérico.

[0179] El término “nativo” con respecto a la estructura de la transtiretina (TTR) se refiere a la estructura plegada normal de TTR en su estado funcional correcto (es decir, un tetrámero de TTR). Como TTR es un tetrámero en su forma nativa plegada, las formas no nativas de TTR incluyen, por ejemplo, tetrámeros de TTR mal plegados, monómeros de TTR, formas agregadas de TTR, y formas fibrilares de TTR. Las formas no nativas de TTR pueden incluir moléculas que comprenden secuencias o mutaciones de aminoácidos de TTR de tipo salvaje.

[0180] La expresión “mal plegadas” con respecto a TTR se refiere a las estructuras secundaria y terciaria de un monómero o multímero de polipéptido de TTR, e indica que el polipéptido ha adoptado una conformación que no es normal para esa proteína en su estado funcional correcto. Aunque el plegamiento incorrecto de TTR puede ser causado por mutaciones en la proteína (por ejemplo, delección, sustitución, o adición), las proteínas de TTR de tipo salvaje también pueden plegarse erróneamente en enfermedades, exponiendo epítopes específicos.

[0181] La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que el portador, diluyente, excipiente, o auxiliar es compatible con los otros ingredientes de la formulación y no sustancialmente perjudicial para el receptor de los mismos.

[0182] El término “paciente” incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciban tanto tratamiento profiláctico como terapéutico.

[0183] Un individuo tiene mayor riesgo de contraer una enfermedad si el sujeto posee al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, genético, bioquímico, historia familiar, y exposición circunstancial) que coloca a las personas con ese factor de riesgo en un riesgo estadísticamente significativo mayor de desarrollar la enfermedad que las personas sin el factor de riesgo.

[0184] La expresión “muestra biológica” se refiere a una muestra de material biológico dentro de, u obtenible a partir de, una fuente biológica, por ejemplo un sujeto humano o mamífero. Dichas muestras pueden ser órganos, organelas, tejidos, secciones de tejidos, fluidos corporales, sangre periférica, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, células, moléculas como proteínas y péptidos, y cualquier parte o combinaciones derivadas de los mismos. La expresión “muestra biológica² puede también abarcar cualquier material derivado del procesamiento de la muestra. El material derivado puede incluir células o su progenie. El procesamiento de la muestra biológica puede involucrar una o más de filtración, destilación, extracción, concentración, fijación, inactivación de componentes interferentes, y lo similar.

[0185] La expresión “muestra control” se refiere a una muestra biológica no conocida o que se sospecha que incluye formas de transtiretina (TTR) monoméricas, mal plegadas, agregadas, o fibrilares, como en depósitos amiloides de TTR. Las muestras control pueden ser obtenidas de individuos no afectados con una amiloidosis de TTR o un tipo de amiloidosis de TTR específicamente elegido. Alternativamente, las muestras control pueden ser obtenidas de pacientes afectados con amiloidosis de TTR o un tipo específicamente elegido de amiloidosis de TTR. Dichas muestras pueden ser obtenidas al mismo tiempo que una muestra biológica que se cree que comprende la amiloidosis de TTR o en una ocasión diferente. Una muestra biológica y una muestra control se pueden obtener del mismo tejido (por ejemplo, una sección de tejido que contiene tanto depósitos amiloides de TTR como tejido normal circundante). Preferentemente, las muestras control consisten esencialmente o enteramente de tejido libre de depósitos amiloides de TTR y pueden ser usadas en comparación a una muestra biológica que se cree comprende depósitos amiloides de TTR. Preferentemente, el tejido en la muestra control es el mismo tipo que el tejido en la muestra biológica (por ejemplo, cardiomiocitos en el corazón).

[0186] El término “enfermedad” se refiere a cualquier condicional anormal que deteriora la función fisiológica. El término se usa ampliamente para abarcar cualquier trastorno, enfermedad, anormalidad, patología, malestar, condición, o síndrome en el que se deteriore la función fisiológica, independientemente de la naturaleza de la etiología.

[0187] El término “síntoma” refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, tal como marcha alterada, como es perceptible por un sujeto. Un “signo” se refiere a evidencia objetiva de una enfermedad observable por un médico.

[0188] Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos están agrupados del siguiente modo: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutrales): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales acidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

[0189] Las identidades de secuencia en porcentaje se determinan con secuencias de anticuerpo máximamente alineadas por la convención de numeración de Kabat. Luego de la alineación, si se compara una región de anticuerpo sujeto (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o liviana) con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre el sujeto y las regiones del anticuerpo de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en el sujeto como en la región del anticuerpo de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contabilizar los espacios, multiplicado por 100 para convertir a porcentaje.

[0190] Las composiciones o métodos que comprenden o incluyen uno o más elementos mencionados pueden incluir otros elementos no específicamente mencionados. Por ejemplo, una composición que “comprende” o “incluye” un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

[0191] La designación de un rango de valores incluye todos los enteros dentro o que definen el rango, y todos los subrangos definidos por enteros dentro del rango.

[0192] Excepto que por el contexto sea evidente lo contrario, el término “aproximadamente” abarca valores dentro de un margen de error estándar de medición (por ejemplo, EEM) de un valor establecido.

[0193] Significancia estadística implica $p \leq 0,05$.

[0194] Los anticuerpos de la invención se pueden administrar concomitantemente con otro tratamiento para la misma indicación que el anticuerpo, es decir que el otro tratamiento se administra al menos una vez durante el periodo en el cual se administra el anticuerpo, comenzando dicho periodo un mes antes de la primera dosis y terminando un mes después de la última dosis del anticuerpo. El otro tratamiento puede ser administrado en intervalos recurrentes durante este periodo, que puede o no ser igual a los intervalos a los que se administra el anticuerpo. El otro tratamiento puede ser un tratamiento sintomático.

[0195] Un tratamiento es sintomático si solo afecta uno o más síntomas de la enfermedad, no su causa, es decir, su etología.

[0196] Las formas singulares de los artículos “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias en plural excepto que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

A menos que sea evidente a partir del contexto cuando la descripción divulga que un producto o método comprende una cierta característica o combinación de características, la descripción deberá ser entendida como que divulga alternativamente que el producto o método consiste en, o consiste esencialmente en, la característica o combinación de características.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

[0197] La invención provee anticuerpos que se unen específicamente a los residuos 101-109 de la transtiretina (TTR). Algunos anticuerpos se unen a cualquiera o todas de las formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR preferentemente en relación con la forma tetramérica nativa de TTR. Algunos anticuerpos se unen a una o ambas formas monoméricas o mal plegadas de TTR preferentemente en relación con la forma tetramérica nativa de TTR. Los anticuerpos pueden ser usados para tratar o efectuar profilaxis de enfermedades o trastornos asociados con acumulación de TTR o acumulación de depósitos de TTR (por ejemplo, amiloidosis por TTR). Los anticuerpos pueden también ser usados para diagnosticar amiloidosis por TTR e inhibir o reducir la agregación de TTR. Los anticuerpos pueden también ser usados para demostrar efectos farmacodinámicos de una terapia de amiloidosis mediada por transtiretina, entre otras aplicaciones. La unión preferencial significa

una constante de asociación de al menos cinco veces mayor para cualquiera o todas las formas monoméricas, mal plegadas, agregadas, o fibrilares de TTR que para la forma nativa tetramérica de TTR. Opcionalmente, la constante de asociación es al menos diez veces mayor para cualquiera o todas las formas monoméricas, mal plegadas, agregadas, o fibrilares de TTR que para la forma tetramérica nativa de TTR. Opcionalmente, el anticuerpo, tal como 18C5, por ejemplo, carece de unión específica a la forma tetramérica nativa de TTR.

II. Moléculas Diana

[0198] La transtiretina (TTR) es una proteína de transporte del suero y del fluido cerebroespinal de 127 aminoácidos, 55 kDa, principalmente sintetizada por el hígado. También se ha referido a ella como prealbúmina, prealbúmina que se une a tiroxina, ATTR, y TBPA. En su estado nativo, la TTR existe como un tetrámero. En homocigotas, los tetrámeros comprenden subunidades ricas en láminas beta idénticas de 127 aminoácidos. En heterocigotas, los tetrámeros de TTR están compuestos de subunidades variables y/o de tipo salvajes, típicamente combinadas en un modo estadístico.

[0199] La función establecida de TTR en la sangre es transportar la proteína de unión a *holo*-retinol. Pese a que la TTR es el mayor portador de tiroxina (T_4) en la sangre de roedores, utilizando sitios de unión que son ortogonales a los utilizados para la proteína de unión a *holo*-retinol, los sitios de unión a T_4 están efectivamente desocupados en seres humanos.

[0200] La TTR es una de al menos treinta proteínas humanas diferentes cuyo plegamiento incorrecto y/o ensamblado incorrecto extracelulares (amiloidogénesis) en un espectro de estructuras agregadas, se cree que causa enfermedades degenerativas las cuales denominadas como enfermedades amiloides. La TTR experimenta cambios conformacionales para convertirse en amiloidogénica. La disociación del tetrámero de TTR y el desplegado parcial expone grandes tramos de residuos hidrofóbicos no cargados en una conformación extendida que eficientemente se despliega en grandes agregados esféricos desestructurados que finalmente experimentan una conversión conformacional a estructuras amiloides de lámina beta-cruzada.

[0201] Excepto que el contexto evidencie lo contrario, la referencia a transtiretina (TTR) o sus fragmentos o dominios incluye las secuencias de aminoácidos naturales humanos que incluyen isoformas, mutantes, y variantes alélicas de los mismos. Secuencias polipeptídicas a modo de ejemplos de TTR son designadas por Números de Acceso P02766.1 (UniProt) (SEQ ID

NO:26), AAB35639.1 (GenBank) (SEQ ID NO:27), AAB35640.1 (GenBank) (SEQ ID NO:28), y ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NO:29). Los residuos son numerados de acuerdo a Swiss Prot P02766.1, con el primer aminoácido de la proteína madura (es decir, sin incluir la secuencia señal de 20 aminoácidos) designado como residuo 1. En cualquier otra proteína TTR, los residuos se enumeran de acuerdo a los correspondientes residuos en P02766.1 en máxima alineación.

III. Amiloidosis por Transtiretina

[0202] La amiloidosis por transtiretina (TTR) es un desorden sistémico caracterizado por TTR patogénica, mal plegada y la deposición extracelular de fibrillas compuestas amiloides de TTR. La amiloidosis por TTR es generalmente causada por la desestabilización de la forma tetramérica nativa de TTR (debido a condiciones ambientales o genéticas), que conducen a disociación, mal plegado, y agregación de TTR en fibrillas amiloides que se acumulan en varios órganos y tejidos, causando progresiva disfunción. Ver, por ejemplo, Almeida y Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

[0203] En seres humanos, tanto los tetrámeros de TTR de tipo salvaje como los tetrámeros mixtos compuestos por subunidades mutantes y de tipo salvaje pueden disociarse, mal plegarse, y agregarse, conduciendo el proceso de amiloidogénesis a la degeneración del tejido afectado. Por lo tanto, las amiloidosis por TTR abarcan enfermedades causadas por TTR mal plegada patógena que resulta de mutaciones en TTR o que resulta de TTR no mutada, mal plegada.

[0204] Por ejemplo, la amiloidosis ATTR de tipo salvaje (también llamada amiloidosis senil sistémica o SSA) y la amiloidosis senil cardíaca (SCA) son tipos de amiloidosis relacionadas con la edad que resultan de la deposición de amiloide de TTR de tipo salvaje por fuera y por dentro de los cardiomiocitos del corazón. La amiloidosis por TTR es también la forma más común de la amiloidosis hereditaria (familiar), que es causada por mutaciones que desestabilizan la proteína TTR. Las amiloidosis por TTR asociadas con mutaciones puntuales en el gen de TTR incluyen polineuropatía familiar amiloide (FAP), miocardiopatía familiar amiloide (FAC), y la rara amiloidosis selectiva de sistema nervioso central (CNSA). Los pacientes con amiloidosis por TTR hereditaria (familiar) son casi siempre heterocigotas, lo que significa que los tetrámeros de TTR están compuestos por subunidades de TTR mutantes y/o de tipo salvaje, generalmente distribuidas estadísticamente. Las versiones hereditarias

(familiares) de la amiloidosis por TTR son generalmente autosómicas dominantes y son iniciadas típicamente más tempranamente que las enfermedades esporádicas (SSA y SCA).

[0205] Hay más de 100 mutaciones en el gen que codifica para TTR que han sido implicadas en los desórdenes autosómicos dominantes FAP y FAC. Ver, por ejemplo, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas y Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet y Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983). Estas mutaciones causantes de amiloides están distribuidas por la molécula entera de TTR. Generalmente, cuanto más desestabilizadoras son las subunidades mutantes de la estructura tetramérica de TTR, más temprano se inicia la enfermedad amiloide. El potencial patogénico de una variante de TTR esta generalmente determinado por una combinación de su inestabilidad y su eficacia de secreción celular. La patología inicial causada por algunas variantes de TTR proviene de su destrucción selectiva del tejido cardíaco, mientras que las de otras variantes de TTR provienen de comprometer el sistema nervioso periférico y autónomo. El daño tisular causado por amiloidogénesis por TTR parece derivar en gran medida de la toxicidad de pequeños agregados de TTR difundibles, aunque la acumulación de amiloide extracelular puede contribuir y casi con toda certeza compromete la estructura del órgano en los últimos estadios de la amiloidosis por TTR.

[0206] La amiloidosis por TTR se presenta en muchas formas diferentes, con una variación fenotípica considerable entre individuos y ubicaciones geográficas. Por ejemplo, la amiloidosis por TTR puede presentarse como una neuropatía progresiva, axonal sensitiva autonómica y motora. La amiloidosis por TTR también puede presentarse como una miocardiopatía infiltrativa.

[0207] La edad de inicio de los síntomas relacionados con la enfermedad varía entre la segunda y la novena década de la vida, con grandes variaciones entre diferentes poblaciones. La participación de múltiples sistemas de la amiloidosis por TTR es una pista para su diagnóstico. Por ejemplo, el diagnóstico de amiloidosis por TTR se considera cuando uno o varios de los siguientes están presentes: (1) historia familiar de enfermedad neuropática, especialmente asociada con falla cardíaca; (2) dolor neuropático o trastornos sensoriales progresivos de etiología desconocida; (3) síndrome de túnel carpiano sin causa obvia, particularmente si es bilateral y requiere liberación quirúrgica; (4) trastornos en la motilidad gastrointestinal o disfunción de nervio autonómico de etiología desconocida (por ejemplo, disfunción eréctil, hipotensión ortostática, vejiga neurogénica); (5) enfermedad cardíaca caracterizada por paredes

ventriculares engrosadas en ausencia de hipertensión; (6) bloqueo atrio-ventricular avanzado de origen desconocido, particularmente cuando está acompañado de un corazón engrosado; y (7) inclusiones de cuerpo vítreo del tipo algodón-lana. Ver Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Otros síntomas pueden incluir, por ejemplo, polineuropatía, pérdida sensorial, dolor, debilidad en miembros inferiores, dishidrosis, diarrea, constipación, pérdida de peso, e incontinencia/retención urinaria.

[0208] El diagnóstico de amiloidosis por TTR típicamente se basa en biopsias de los órganos diana, seguido por tinción histológica del tejido extirpado con el colorante amiloide-específico, rojo Congo. Si se observa una prueba positiva para amiloide, posteriormente se realiza una tinción inmunohistoquímica y una identificación por espectrometría de masas para asegurar que la proteína precursora responsable de la formación amiloide es en efecto TTR. Los anticuerpos descritos aquí son útiles para distinguir amiloidosis por TTR de una amiloidosis no por TTR por ejemplo amiloidosis por amiloide de cadena liviana (AL), también conocida como una amiloidosis primaria sistémica. Para las formas familiares de la enfermedad, la demostración de una mutación en el gen que codifica para TTR es entonces necesaria antes de que se pueda realizar el diagnóstico. Esto se puede lograr, por ejemplo, a través de electroforesis por isoelectroenfoque, reacción en cadena de la polimerasa, o disección por láser/cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem. Ver, ejemplo, US 2014/0056904; Ruberg y Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

IV. Anticuerpos

A. Especificidad de Unión y Propiedades Funcionales

[0209] La invención provee anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína transtiretina (TTR), más específicamente, a epítopes dentro de los residuos aminoácidos 101-109 (SEQ ID NO:30) de la TTR. Dichos epítopes están escondidos en el tetrámero nativo de TTR y expuestos en las formas de TTR monoméricas, mal plegadas, agregadas, o fibrilares.

[0210] Uno de dichos anticuerpos es 18C5 y sus formas quiméricas, revestidas y humanizadas. Este anticuerpo se une específicamente dentro de los residuos aminoácidos 101-109 (SEQ ID NO:30) de la TTR. Este anticuerpo se caracteriza además por su capacidad de unirse a las formas de TTR monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares pero no a la forma de TTR nativa tetramérica. La capacidad de unirse a proteínas específicas o fragmentos de las mismas

puede ser demostrada usando formatos de ensayos a modo de ejemplo proporcionados en los ejemplos. Excepto que el contexto evidencie lo contrario, la referencia a 18C5 debe ser entendida refiriéndose a cualquiera de las formas de ratón, quimérica, revestida o humanizada. Una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 18C5 fue depositada con el Depósito de Patentes de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, 20110-2209 el 31 de octubre de 2017 y se le asignó el Depósito de Patente No. PTA-124570.

[0211] Algunos anticuerpos se unen al mismo epítotope o epítotoes superpuestos que el anticuerpo designado 18C5. Las secuencias de las regiones variables maduras de las cadenas pesada y liviana de 18C5 se denominan SEQ ID NOs: 1 y 3, respectivamente. Otros anticuerpos que poseen tal especificidad de unión pueden ser producidos mediante la inmunización de ratones con TTR, o una porción de la misma que incluye el epítotope deseado (por ejemplo, SEQ ID NO:30), y relevando los anticuerpos resultantes en cuanto a unión a TTR monomérica o a un péptido que comprende la SEQ ID NO:30, opcionalmente en competición con un anticuerpo que posea las regiones variables de 18C5 de ratón (IgG1, kappa). Los fragmentos de TTR que incluyen el epítotope deseado se pueden unir a un portador que ayuda a provocar una respuesta de anticuerpos al fragmento y/o se puede combinar con un adyuvante que ayude a provocar dicha respuesta. Dichos anticuerpos pueden ser relevados en cuanto a unión diferencial a versiones monoméricas de tipo salvaje de TTR o un fragmento de las mismas (por ejemplo, SEQ ID NO:26) en comparación con mutantes de residuos especificados. El relevamiento frente a dichos mutantes define más precisamente la especificidad de unión para permitir la identificación de anticuerpos cuya unión es inhibida por mutagénesis de residuos particulares y que son factibles de compartir las propiedades funcionales de otros anticuerpos ejemplificados. Las mutaciones pueden ser sustituciones de reemplazo sistemático con alanina (o serina o glicina si una alanina ya está presente) un residuo a la vez, o de intervalos más ampliamente espaciados, por toda la diana o por toda una sección de la misma en la cual se sabe que reside un epítotope. Si el mismo conjunto de mutaciones reduce significativamente la unión de dos anticuerpos, los dos anticuerpos se unen al mismo epítotope.

[0212] Los anticuerpos que poseen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (por ejemplo, 18C5) también pueden ser producidos usando una variante del método de presentación en fagos (*phage display*). Ver Winter, WO 92/20791. Este método es particularmente adecuado para producir anticuerpos humanos. En este método, se usa la región variable de la cadena pesada o liviana del anticuerpo murino seleccionado como material de

partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena liviana como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la cual los miembros muestran la misma región variable de la cadena liviana (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada pueden obtenerse por ejemplo de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humanas reordenadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte especificidad de unión (por ejemplo, al menos 10^8 y preferentemente al menos 10^9 M⁻¹) para TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, los residuos aminoácidos 101-109). La región variable de cadena pesada de este fago luego sirve como material de partida para construir una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir, la región identificada de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de cadena liviana diferente. Las regiones variables de cadena liviana se pueden obtener por ejemplo a partir de una biblioteca de regiones de cadena liviana variable humana reordenada. Nuevamente, se seleccionan los fagos que muestran fuerte especificidad de unión para TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos aminoácidos 101-109). Los anticuerpos resultantes generalmente tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material murino de partida.

[0213] Otros anticuerpos pueden obtenerse por mutagénesis de ADNc que codifican las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo a modo de ejemplo, como 18C5. Los anticuerpos monoclonales que son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticos a 18C5 en secuencia de aminoácidos de las regiones variables maduras de las cadenas pesada y/o liviana y que mantienen sus propiedades funcionales, y/o que difieren del anticuerpo respectivo por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos sin consecuencias funcionales (por ejemplo, sustituciones conservativas), deleciones, o inserciones, también están incluidas en la invención. Se incluyen también anticuerpos monoclonales que tienen al menos una o todas las seis CDRs como se define por definición convencional, pero preferentemente Kabat, que son 90%, 95%, 99% o 100% idénticos a CDRs correspondientes de 18C5.

[0214] La invención también provee anticuerpos que tienen algunas o todas (por ejemplo, 3, 4, 5, y 6) CDRs enteramente o sustancialmente de 18C5. Dichos anticuerpos pueden incluir una región variable de cadena pesada que tiene al menos dos, y usualmente las tres, CDRs enteramente o sustancialmente de la región variable de la cadena pesada de 18C5 y/o una región

variable de cadena liviana que tiene al menos dos, y usualmente las tres, CDRs enteramente o sustancialmente de la región variable de cadena liviana de 18C5. Los anticuerpos pueden incluir ambas cadenas pesada y liviana. Una CDR es sustancialmente de una CDR de 18C5 correspondiente cuando contiene no más de 4, 3, 2, o 1 sustituciones, inserciones, o deleciones, excepto que CDR-H2 (cuando se define por Kabat) no puede tener más de 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, inserciones o deleciones. Dichos anticuerpos pueden tener al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con 18C5 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables maduras de las cadenas pesada y/o liviana y mantienen sus propiedades funcionales, y/o difieren de 18C5 por un número pequeño de sustituciones de aminoácidos sin consecuencias funcionales (por ejemplo, sustituciones conservativas), deleciones, o inserciones.

[0215] Las CDRs de Kabat/Chothia Composite (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) de la cadena pesada de 18C5 son designadas SEQ ID NOs: 5, 7, y 9, respectivamente, y CDRs de Kabat/Chothia Composite (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) de la cadena liviana de 18C5 son designadas SEQ ID NOs: 11, 13, y 15, respectivamente.

[0216] La Tabla 2 indica las CDRs de 18C5 definidas según Kabat, Chothia, Composite de Chothia y Kabat (también referido en la presente como “Kabat/Chothia Composite”), AbM y Contact.

Tabla 2

CDRs de 18C5 definidas según Kabat, Chothia, Composite de Chothia y Kabat, AbM, y Contact, Utilizando Numeración de Kabat

Bucle	Kabat	Chothia	Combinación de Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L24--L34 SEQ ID NO:11	L30--L36 SEQ ID NO: 100
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L46--L55 SEQ ID NO: 101
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO:15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L96 SEQ ID NO: 102
H1	H31--H35B SEQ ID NO: 93	H26--H32 SEQ ID NO: 94	H26--H35B SEQ ID NO:5	H26--H35B SEQ ID NO:5	H30--H35B SEQ ID NO: 95
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H52--H56 SEQ ID NO: 96	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H50--H58 SEQ ID NO: 97	H47--H58 SEQ ID NO: 98
H3	H95--H102 SEQ ID NO:9	H95--H102 SEQ ID NO:9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H93--H101 SEQ ID NO: 99

[0217] Algunos anticuerpos identificados por dichos ensayos pueden unirse a formas de TTR monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares pero no a la forma nativa tetramérica de

TTR, como se describe en los ejemplos o de otra manera. Asimismo, algunos anticuerpos son inmunorreactivos en el tejido de amiloidosis mediada por TTR pero no en el tejido sano.

[0218] Algunos anticuerpos pueden inhibir o reducir la agregación de TTR, inhibir o reducir la formación fibrilar de TTR, reducir o eliminar los depósitos de TTR o TTR agregada, o estabilizar conformaciones no tóxicas de TTR en un modelo animal o ensayo clínico. Algunos anticuerpos pueden tratar, efectuar profilaxis de, o demorar el inicio de, una amiloidosis por TTR como se muestra en un modelo animal o ensayo clínico. Los modelos animales a modo de ejemplo para evaluar la actividad contra amiloidosis por TTR incluyen aquellos descritos en Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Teng *et al.*, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001); Wakasugi *et al.*, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987); Shimada *et al.*, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989); Nagata *et al.*, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995); Sousa *et al.*, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002); y Santos *et al.*, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010).

[0219] Un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR puede ser identificado mediante inmunización de un animal con TTR o un fragmento de la misma y relevando los anticuerpos inducidos para identificar un anticuerpo que se une dentro de los residuos 101-109 de TTR. El animal puede ser por ejemplo, un roedor, como un ratón, conejo o rata. El animal puede ser transgénico, como un roedor modificado para tener genes de inmunoglobulinas humanas. Un fragmento usado para inmunización puede ser un fragmento de no más de 25 residuos contiguos de TTR incluyendo al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos contiguos dentro de los residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede consistir de los residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede estar unido a un portador para ayudar a provocar la inducción de anticuerpos. El anticuerpo puede ser relevado determinando si el anticuerpo se une a un fragmento de TTR compuesto por los residuos 101-109. Opcionalmente, el anticuerpo puede también ser relevado en cuanto unión a la TTR de longitud completa.

[0220] Un anticuerpo que se une a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR puede ser identificado mediante provisión de una biblioteca de presentación de anticuerpos, y relevamiento de la biblioteca de presentación para identificar un anticuerpo que se une dentro de los residuos 101-109 de TTR. La biblioteca de presentación puede ser una biblioteca de presentación de fagos, una biblioteca de presentación de levaduras, una biblioteca de presentación de ribosomas entre otras. La biblioteca de presentación puede, por ejemplo, mostrar anticuerpos como fragmentos Fv o Fabs. La biblioteca de presentación puede ser una

biblioteca de presentación *naïve*. Métodos para aislar anticuerpos de bibliotecas de presentación de fagos están expuestos, por ejemplo, en WO 2017/207739. Alternativamente, la biblioteca de presentación puede ser producida mediante inmunización de un roedor con TTR o un fragmento de la misma y clonación de los ácidos nucleicos que codifican para las cadenas pesada y liviana de anticuerpos en un vector de presentación. El roedor puede ser, por ejemplo, un ratón, conejo o rata. Un fragmento usado para inmunización puede ser un fragmento de no más de 25 residuos contiguos de TTR que incluyen al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos contiguos dentro de los residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede consistir de residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede estar unido a un portador para ayudar a provocar la inducción de anticuerpos. Los miembros de la biblioteca pueden ser relevados en cuanto a unión a un fragmento de TTR compuesto por los residuos 101-109. Opcionalmente, los miembros de la biblioteca pueden también ser relevados en cuanto a unión a la TTR de longitud completa. Los miembros de la biblioteca pueden ser relevados en la presencia de un anticuerpo de referencia que se une a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR. El anticuerpo de referencia puede ser el anticuerpo 18C5.

[0221] Un anticuerpo de prueba que compite por la unión con el anticuerpo 18C5 para la unión a TTR se puede identificar poniendo en contacto TTR con el anticuerpo de ensayo en presencia o ausencia del anticuerpo 18C5 y determinando la unión del anticuerpo a TTR. La unión disminuida del anticuerpo en presencia del anticuerpo 18C5 indica que el anticuerpo compite con el anticuerpo 18C5 por la unión a TTR. Alternativa o adicionalmente, el ensayo se puede realizar poniendo en contacto TTR con el anticuerpo 18C5 en presencia o ausencia de un anticuerpo de ensayo, en cuyo caso la unión reducida de 18C5 a TTR en presencia del anticuerpo de ensayo indica competencia.

[0222] Un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 18C5 en TTR se puede identificar determinando el epítipo al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR, inmunizando un animal con TTR o un fragmento de la misma, y relevando los anticuerpos inducidos para identificar una unión de anticuerpo al mismo epítipo que el anticuerpo 18C5. El animal puede ser por ejemplo, un roedor, como un ratón, conejo o rata. El animal puede ser transgénico, como un roedor modificado para tener los genes de inmunoglobulinas humanas.

[0223] Un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 18C5 en TTR se puede identificar determinando el epítipo al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR, proporcionando

una biblioteca de presentación de anticuerpos, y relevando la biblioteca de presentación para identificar una unión de anticuerpo al mismo epítipo que el anticuerpo 18C5. La biblioteca de presentación puede ser una biblioteca de presentación de fagos, presentación de levaduras o presentación de ribosomas. La biblioteca de presentación puede, por ejemplo, mostrar anticuerpos como fragmentos Fv o fragmentos Fab. La biblioteca de presentación puede ser una biblioteca de presentación *naïve*. Los métodos para aislar anticuerpos de una biblioteca de presentación de fagos están expuestos, por ejemplo, en WO 2017/207739.

[0224] Los anticuerpos también se pueden producir por un método de presentación en fagos para tener la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (por ejemplo, 18C5). En este método, se usa tanto la región variable de la cadena pesada como de la liviana del anticuerpo murino seleccionado como material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de cadena liviana es seleccionada como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la que los miembros muestran la misma región variable de la cadena liviana (es decir, el material de partida murino) y una región variable de la cadena pesada diferente. Las regiones variables de la cadena pesada pueden ser obtenidas por ejemplo a partir de una biblioteca de regiones variables de la cadena pesada humana reordenada. Se selecciona un fago que muestre especificidad de unión fuerte (por ejemplo, al menos 10^8 y preferentemente al menos 10^9 M⁻¹) para TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos aminoácidos 101-109). La región variable de cadena pesada de este fago entonces sirve como material de partida para construir una posterior biblioteca de fagos. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de la cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de la cadena liviana diferente. Las regiones variables de la cadena liviana pueden ser obtenidas por ejemplo de una biblioteca de regiones variables de la cadena liviana humana reordenada. Nuevamente, se seleccionan los fagos que muestran fuerte especificidad de unión con TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos aminoácidos 101-109). Los anticuerpos resultantes usualmente tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

[0225] Se puede producir una biblioteca de presentación para producir una unión de anticuerpo al mismo epítipo que el anticuerpo 18C5 en TTR inmunizando un roedor con TTR o un fragmento de la misma y clonando los ácidos nucleicos que codifiquen las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos en un vector de presentación. El roedor puede ser, por ejemplo, un ratón, conejo o rata. Un fragmento usado para inmunización puede ser un fragmento de no

más de 25 residuos contiguos de TTR incluyendo al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 residuos contiguos dentro de los residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede estar compuesto de los residuos 101-109 de TTR. Un fragmento usado para inmunización puede estar unido a un portador para ayudar a provocar la inducción de anticuerpos.

[0226] Los miembros de las bibliotecas de presentación pueden ser relevados en cuanto a unión a un fragmento de TTR compuesto por los residuos 101-109. Opcionalmente, los miembros de la biblioteca puede ser también relevados en cuanto a unión a TTR de longitud completa. Los miembros de la biblioteca pueden ser relevados en presencia de un anticuerpo de referencia que se une a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR. El anticuerpo de referencia puede ser el anticuerpo 18C5.

[0227] El epítipo al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR puede ser determinado, por ejemplo, por medición de la unión de 18C5 a las versiones de TTR de tipo salvaje, monoméricas o un fragmento de las mismas comparado con mutantes de determinados residuos. Las mutaciones pueden ser sustituciones de reemplazo sistemático con alanina (o serina o glicina si una alanina ya está presente) un residuo a la vez, o intervalos más ampliamente espaciados, por todo el blanco o por toda una sección del mismo en la cual se sabe que reside un epítipo. Dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. El epítipo al cual se une el anticuerpo 18C5 en TTR puede también ser determinado por cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar residuos en contacto. Dos anticuerpos unen el mismo epítipo si ellos tienen los mismos residuos de contacto.

[0228] Los anticuerpos anti-TTR que se unen a epítopes de TTR diferentes a los de 18C5, incluyendo versiones quimérica y humanizadas del mismo, son útiles en terapias de combinación, en anticuerpos biespecíficos, en métodos de diagnóstico y/o tratamiento de trastornos asociados a TTR, y en métodos de detección de TTR, con anticuerpos 18C5 de la invención. Dichos anticuerpos anti-TTR que se unen a epítopes de TTR diferentes a los de 18C5 pueden incluir anticuerpos como en la Tabla 3 a continuación.

[0229] Tabla 3: Anticuerpos anti-TTR. .

Nombre	Epítotope en TTR como informado	VH/VL o CDRs como informado	Referencia
9D5	EHAEEVVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDRs: CDR-H1 SEQ ID NO:75 CDR-H2 SEQ ID NO:76 CDR-H3 SEQ ID NO:77 CDR-L1 SEQ ID NO:78 CDR-L2 SEQ ID NO:79 CDR-L3 SEQ ID NO:80	WO 2016/120810 A1 ATCC Depósito N°PTA-124078 Fecha: Abril 4, 2017
14G8	EHAEEVVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDRs CDR-H1 SEQ ID NO:39 CDR-H2 SEQ ID NO:40 CDR-H3 SEQ ID NO:41 CDR-L1 SEQ ID NO:42 CDR-L2 SEQ ID NO:43 CDR-L3 SEQ ID NO:44	WO 2016/120810 A1 ATCC Depósito N° PTA-124079 Fecha: Abril 4, 2017
5A1	EHAEEVVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDRs CDR-H1 SEQ ID NO:46 CDR-H2 SEQ ID NO:47 CDR-H3 SEQ ID NO:48 CDR-L1 SEQ ID NO 49 CDR-L2 SEQ ID NO :50 CDR-L3 SEQ ID NO: 51	WO 2016/120811 ATCC Depósito N° PTA-124080 Fecha: Abril 4, 2017
6C1	EHAEEVVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDRs CDR-H1 SEQ ID NO:52 CDR-H2 SEQ ID NO:53 CDR-H3 SEQ ID NO: 54	WO 2016/120809 ATCC Depósito N° PTA-124077 Fecha: Abril 4, 2017

Nombre	Epítotope en TTR como informado	VH/VL o CDRs como informado	Referencia
		CDR-L1 SEQ ID NO: 55 CDR-L2 SEQ ID NO:56 CDR-L3 SEQ ID NO: 57	
AD7F6		VH SEQ ID NO: 58 VL SEQ ID NO: 59	WO 2010/030203 A1
RT24	118-122, 115-124	CDR-H1 SEQ ID NO:60 CDR-H2 SEQ ID NO:61 CDR-H3 SEQ ID NO: 62 CDR-L1 SEQ ID NO: 63 CDR-L2 SEQ ID NO: 64 CDR-L3 SEQ ID NO: 65	WO 2015/115331
NI-301.35G11	53-63, 54-61	CDR-H1 SEQ ID NO: 66 CDR-H2 SEQ ID NO: 67 CDR-H3 SEQ ID NO:68 CDR-L1 SEQ ID NO: 69 CDR-L2 SEQ ID NO: 70 CDR-L3 SEQ ID NO:71	US 2016/0355576 A1
MFD101, MDF102, MFD103, MFD105	ADDTWEPFASGKT (residuos 36-49) (SEQ ID NO:72)		US 2016/0039916 A1
MFD107, MFD108, MFD109, MFD111	TSESGELHGLTTE (residuos 49-61) (SEQ ID NO:73)		US 2016/0039916 A1
MFD114	ALLSPYSYSTTAV (residuos 109-121) (SEQ ID NO:74)		US 2016/0039916 A1
	30-66		US 2016/0039916 A1
	70-127		US 2016/0039916 A1

Nombre	Epítotope en TTR como informado	VH/VL o CDRs como informado	Referencia
	80-127		US 2016/0039916 A1
	90-127		US 2016/0039916 A1
	100-127		US 2016/0039916 A1
	110-127		US 2016/0039916 A1
	115-127		US 2016/0039916 A1

B. Anticuerpos no humanos

[0230] La producción de otros anticuerpos no humanos, por ejemplo, murinos, de cobayo, de primate, de conejo o de rata, contra TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos aminoácidos 101-109) puede ser lograda mediante, por ejemplo, inmunización del animal con TTR o un fragmento de la misma. Ver Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (incorporado como referencia a todos los efectos). Dicho inmunógeno puede ser obtenido de una fuente natural, por síntesis peptídica, o por expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede ser administrado fusionado o de otro modo complejoado con una proteína portadora. Opcionalmente, el inmunógeno puede ser administrado con un adyuvante. Varios tipos de adyuvantes pueden ser usados como se describe posteriormente. El adyuvante completo de Freund seguido por adyuvante incompleto es preferido para la inmunización de animales de laboratorio. Los conejos o cobayos son típicamente usados para hacer anticuerpos policlonales. Los ratones son típicamente usados para hacer anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son relevados en cuanto a unión específica a la TTR monomérica o un epítotope dentro de TTR (por ejemplo, un epítotope que comprende uno o más de los residuos aminoácidos 101-109). Dicho relevamiento puede ser logrado por determinación de la unión de un anticuerpo a una colección de variantes monoméricas de TTR, como variantes de TTR que contienen residuos aminoácidos 101-109 o mutaciones dentro de estos residuos, y determinando cuáles variantes de TTR se unen al anticuerpo. La unión puede ser evaluada, por ejemplo, por Western blot, FACS o ELISA.

C. Anticuerpos humanizados

[0231] Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente diseñado en el cual las CDRs de un anticuerpo “donante” no humano son injertadas en secuencias de anticuerpo “aceptor” humano (ver, por ejemplo, Queen, US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, US 5.225.539; Carter, US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, US 6.881.557). Las secuencias del

anticuerpo aceptor pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano maduro, un compuesto de dichas secuencias, una secuencia consenso de secuencias de anticuerpo humano, o una secuencia de la región de línea germinal. Por tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene al menos tres, cuatro, cinco, o todas las CDRs enteramente o sustancialmente de un anticuerpo donante y secuencias marco de región variable y regiones constantes, si están presentes, enteramente o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. Similarmente una cadena pesada humanizada tiene al menos uno, dos y usualmente las tres CDRs enteramente o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante, y una secuencia marco de región variable de cadena pesada y región constante de cadena pesada, si está presente, sustancialmente de secuencias marco de región variable de la cadena pesada humana y de región constante. Similarmente una cadena liviana humanizada tiene al menos una, dos o usualmente las tres CDRs enteramente o sustancialmente de una cadena liviana de anticuerpos donantes, y una secuencia marco de región variable de cadena liviana y región constante de cadena liviana, si está presente, sustancialmente de secuencias marco de región variable de la cadena liviana humana y de región constante. Además de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena liviana humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de una correspondiente CDR en un anticuerpo no humano cuando al menos 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (según lo definido por cualquier definición convencional pero preferentemente definido por Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. Las secuencias marco de región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia de marco de región variable humana o región constante humana respectivamente cuando al menos 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes definidos por cualquier definición convencional pero preferentemente definidos por Kabat son idénticos. Para ser clasificado como humanizado bajo la definición 2014 de nombres no propietarios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, INN por sus siglas en inglés) de los anticuerpos humanizados, un anticuerpo debe tener al menos 85% de identidad en las regiones variables maduras en relación con las secuencias del anticuerpo de línea germinal humana (es decir, antes de hipermutación somática). Anticuerpos mixtos son anticuerpos para los cuales una cadena del anticuerpo (por ej. la cadena pesada) alcanza el umbral pero la otra cadena (por ej. la cadena liviana) no alcanza el umbral. Un anticuerpo es clasificado como quimérico si ninguna de las cadenas alcanza el umbral, aún cuando las regiones marco variables para ambas cadenas sean sustancialmente humanas con algunas retromutaciones murinas. Ver Jones et al. (2016) *The INNs and outs of antibody*

nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. Ver también “WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>), incorporados a la presente como referencia. Para evitar dudas, el término “humanizado” como se utiliza en la presente no está destinado a estar limitado a la definición 2014 WHO INN de anticuerpos humanizados. Algunos de los anticuerpos humanizados provistos en la presente tienen al menos 85% de identidad de secuencia con las secuencias de línea germinal humana en una o ambas de las regiones variables maduras y algunos de los anticuerpos humanizados provistos en la presente tienen menos de 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana en una o ambas regiones variables maduras. Algunas de las regiones variables de la cadena pesada madura de los anticuerpos humanizados provistos en la presente tienen desde aproximadamente 60% a 100% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, tal como, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 60% a 69%, 70% a 79%, 80% a 84%, u 85% a 89%. Algunas de las regiones variables de la cadena pesada madura caen por debajo de la definición 2014 WHO INN y tienen, por ejemplo, aproximadamente 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, o 82%, 83%, o 84% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, mientras que otras regiones variables de la cadena pesada cumplen la definición 2014 WHO INN y tienen aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89% o más de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana. Algunas de las regiones variables de la cadena liviana madura de los anticuerpos humanizados provistos en la presente tienen desde aproximadamente 60% a 100% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, tal como por ejemplo, en el rango de aproximadamente 80% a 84% u 85% a 89%. Alguna de las regiones variables de la cadena liviana madura caen dentro de la definición 2014 WHO INN y tienen, por ejemplo, aproximadamente 81%, 82%, 83% u 84% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, mientras que otras regiones variables de la cadena liviana madura cumplen la definición 2014 WHO INN y tienen aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89% o más de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana. Algunos anticuerpos humanizados provistos en la presente que son “quiméricos” bajo la definición 2014 WHO INN tienen regiones variables de la cadena pesada madura con menos de 85% de identidad con las secuencias de la línea germinal humana apareadas con las regiones variables de la cadena liviana madura que tienen menos de 85% de identidad con las secuencias de la línea germinal humana. Algunos anticuerpos humanizados provistos en la presente son

“mixtos” bajo la definición 2014 WHO INN, por ejemplo, tienen una región variable de la cadena pesada madura con al menos 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana apareadas con una región variable de la cadena liviana madura que tiene menos de 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, o viceversa. Algunos anticuerpos humanizados provistos en la presente cumplen con la definición de “humanizados” de 2014 WHO INN y tienen una región variable de la cadena pesada madura con al menos 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana apareadas con una región variable de la cadena liviana madura que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana. Anticuerpos 18C5 a modo de ejemplo que cumplen la definición 2014 WHO INN de “humanizados” incluyen anticuerpos que tiene una región variable de cadena pesada madura con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:85 o SEQ ID NO:86 apareadas con una región variable de cadena liviana madura que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:91 o SEQ ID NO:92.

[0232] Pese a que los anticuerpos humanizados frecuentemente incorporan las seis CDRs (preferentemente como se definió por Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de todas las CDRs (por ejemplo, al menos 3, 4, o 5 CDRs) de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis *et al.*, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura *et al.*, *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

[0233] En algunos anticuerpos solo parte de las CDRs, concretamente el subconjunto de residuos de CDRs requeridos para la unión, denominados los SDR, son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no hacen contacto con el antígeno y no están en los SDRs pueden ser identificados basados en estudios previos (por ejemplo residuos H60-H65 en CDR H2 son generalmente no requeridos), de regiones de CDR de Kabat situadas fuera de bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), por modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en posiciones en las cuales uno o más residuos de CDR del donante está ausente o en las cuales una CDR donante entera esta omitida, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la correspondiente posición (por numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor.

El número de tales sustituciones de aceptores por aminoácidos donantes en las CDRs para ser incluidas refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y consecuentemente disminuir la potencial inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones pueden también causar cambios de afinidad, y se evitan preferentemente reducciones significativas en afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDRs y aminoácidos para sustituir también pueden ser seleccionadas empíricamente.

[0234] Las secuencias del anticuerpo humano aceptor pueden ser opcionalmente seleccionadas de entre las muchas secuencias de anticuerpos humanos conocidas para proveer un alto grado de identidad de secuencia (por ejemplo, 65-85% identidad) entre marcos de región variable de una secuencia aceptora humana y marcos de región variable correspondientes de una cadena de anticuerpo de donante.

[0235] Un ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena pesada de 18C5 es la VH Fab Crenezumab (CreneFab) humanizada, con código de acceso PDB 5VZY (SEQ ID NO:83). Un ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena liviana de 18C5 es la VL Fab Crenezumab (CreneFab) humanizada con código de acceso PDB 5VZY (SEQ ID NO:89). Otro ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena liviana de 18C5 es el gen IGKV2-30*02 de línea germinal humana (SEQ ID NO:90).

[0236] Si se selecciona más de una secuencia de anticuerpo humano aceptor para una cadena (sea liviana o pesada), puede utilizarse un compuesto o híbrido de esos aceptores para esa cadena, y los aminoácidos utilizados pueden ser tomados de cualquiera de las secuencias de anticuerpo aceptor humano utilizadas.

[0237] Algunos aminoácidos de los residuos del marco de región variable humana pueden ser seleccionados para sustitución basados en su posible influencia sobre la conformación de CDRs y/o la unión al antígeno. La investigación de dichas posibles influencias es por modelado, examinación de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, u observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

[0238] Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humana seleccionado, el aminoácido marco

humano puede ser sustituido por el aminoácido marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una no covalentemente al antígeno directamente;
- (2) sea adyacente a una región CDR o dentro de una CDR según lo definido por Chothia pero no Kabat;
- (3) de otra manera interactúe con una región CDR (por ejemplo, que esté dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR), (por ejemplo, identificado por modelado de la cadena liviana o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina homóloga conocida); o
- (4) sea un residuo que participa en la interfase VL-VH.

[0239] La invención provee formas humanizadas del anticuerpo 18C5 murino que incluyen 2 regiones variables maduras de la cadena pesada humanizada ejemplificadas (hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85), y hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)), y 2 regiones variables maduras de la cadena liviana ejemplificadas (hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91) y hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92))

[0240] En una forma de realización, las secuencias humanizadas son generadas utilizando un protocolo PCR de dos etapas que permite la introducción de múltiples mutaciones, deleciones e inserciones utilizando mutagénesis dirigida a sitio QuikChange [Wang, W. y Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682)].

[0241] Residuos de marco de clases (1) a (3) tal como definió Queen, US 5.530.101, a veces se denominan alternativamente como residuos canónicos y vernier. Residuos de marco que ayudan a definir la conformación de un bucle de CDR a veces se denominan residuos canónicos (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). Los residuos de marco que soportan las conformaciones del bucle de unión a antígeno y desempeñan un rol en refinar el ajuste de un anticuerpo al antígeno a veces se denominan residuos de vernier. (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

[0242] Otros residuos de marco que son candidatos para sustitución son residuos que crean un sitio potencial de glicosilación. Aun otros candidatos para sustitución son aminoácidos de marco aceptores humanos que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos con aminoácidos de la posición equivalente

del anticuerpo de ratón donante o de la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas.

[0243] Otros residuos de marco que son candidatos para sustitución son los residuos de ácido glutámico (E) N-terminales que pueden ser reemplazados con glutamina (Q).

[0244] Anticuerpos humanizados a modo de ejemplo son formas humanizadas del 18C5 de ratón, designadas hu18c5.

[0245] El anticuerpo 18C5 de ratón comprende regiones variables maduras de la cadena pesada y de la cadena liviana que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO:81 y SEQ ID NO:87, respectivamente. La invención provee 2 regiones variables maduras de la cadena pesada humanizadas a modo de ejemplo: hu18C5-VH_v1 y hu18C5-VH_v2. La invención provee además 2 regiones variables maduras de la cadena liviana a modo de ejemplo: hu18C5-VL_v1 y hu18C5-VL_v2. El alineamiento de 18C5 murino y varios anticuerpos humanizados es mostrado para las regiones variables de la cadena liviana (Tabla 6 y Figura 4), y las regiones variables de la cadena pesada (Tabla 7 y Figura 3).

[0246] Por razones tales como posible influencia en la conformación de CDRs y/o unión a antígeno, que median la interacción entre cadenas pesada y liviana, la interacción con la región constante, siendo un sitio para la modificación post-traducciona deseada o no deseada, siendo un residuo inusual para su posición en una secuencia de región variable humana y por lo tanto potencialmente inmunógena, obteniendo potencial de agregación, y otras razones, las siguientes 8 posiciones de marco de la región variable de 18C5 fueron consideradas como candidatas para sustituciones en las 2 regiones variables maduras de la cadena liviana humana a modo de ejemplo y las 2 regiones variables maduras de la cadena pesada a modo de ejemplo, como se especifica adicionalmente en el Ejemplo 7: L2 (I2V), L45 (Q45R), H37 (V37A), H45 (L45Q), H47 (L47W), H48 (V48I), H49 (A49G), y H94 (S94R).

[0247] Aquí, como en cualquier otro lugar, el residuo mencionado en primer lugar es el residuo de un anticuerpo humanizado formado por injerto de CDR de Kabat o una CDR compuesta de Chothia Kabat en el caso de CDR-H1 en un marco aceptor humano, y el residuo mencionado en segundo lugar es un residuo considerado para reemplazar dicho residuo. Entonces, dentro de los marcos de región variable, el residuo mencionado en primer lugar es humano, y dentro de las CDRs, el residuo mencionado en primer lugar es de ratón.

[0248] Las regiones CDRs de dichos anticuerpos humanizados pueden ser idénticas o sustancialmente idénticas a las regiones CDRs del anticuerpo donante de ratón 18C5. Las regiones CDRs pueden ser definidas por cualquier definición convencional, como aquellas en la Tabla 1, pero son preferibles según lo definido por Kabat o el Kabat+Chothia Composite.

[0249] Las posiciones de marco de regiones variables están de acuerdo con la numeración de Kabat a menos que se indique lo contrario.

[0250] Una posibilidad de variación adicional en las variantes humanizadas de 18C5 son retromutaciones adicionales en los marcos de región variable. Muchos de los residuos de marco que no están en contacto con las CDRs en los mAb humanizados pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las correspondientes posiciones del mAb del ratón donante u otro anticuerpos de ratón o humanos, e incluso muchos potenciales residuos en contacto con CDRs son también sensibles para sustitución. Incluso aminoácidos dentro de las CDRs pueden ser alterados, por ejemplo, con residuos encontrados en las posiciones correspondientes de la secuencia del aceptor humano usada para suministrar marcos de región variable. Además, pueden utilizarse secuencias de aceptor humano alternativas, por ejemplo, para la cadena pesada y/o liviana. Si se usan diferentes secuencias de aceptor, una o más de las retromutaciones recomendadas anteriormente pueden no ser realizadas porque los correspondientes residuos donante y aceptor ya son los mismos sin las retromutaciones.

[0251] Algunos reemplazos o retromutaciones en variantes de Hu18C5 (sean o no conservativas) no tienen efecto sustancial sobre la afinidad de unión o potencia del mAb humanizado, que es, su capacidad para unirse a TTR monomérica (por ejemplo, la potencia en algunos o todos los ensayos descritos en los presentes ejemplos de la variante del anticuerpo 18C5 humanizado es esencialmente la misma, es decir, dentro del error experimental, como aquél del 18C5 murino).

D. Anticuerpos Quiméricos y Revestidos

[0252] La invención además provee formas quiméricas y revestidas de anticuerpos no humanos, particularmente los anticuerpos 18C5 de los ejemplos.

[0253] Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de las cadenas liviana y pesada de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) son combinadas con regiones constantes de cadena liviana y pesada humanas. Dichos anticuerpos

sustancialmente o enteramente retienen la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, y son alrededor de dos tercios de la secuencia humana. En una forma de realización, un anticuerpo 18C5 quimérico tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada de SEQ ID NO:81, una secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena liviana de SEQ ID NO:87, una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana de SEQ ID NO: 17, y una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena liviana humana de SEQ ID NO: 19.

[0254] Un anticuerpo revestido es un tipo de anticuerpo humanizado que retiene algunas y usualmente todas las CDR y algunos de los residuos del marco de región variable no humana de un anticuerpo no humano pero reemplaza otros residuos del marco de región variable que pueden contribuir a epítopes de células B o T, por ejemplo residuos expuestos (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDRs son enteramente o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de región variable del anticuerpo no humano se hacen más parecidos a los humanos mediante las sustituciones. Las formas revestidas del anticuerpo 18C5 están incluidas en la invención.

E. Anticuerpos Humanos

[0255] Anticuerpos humanos contra TTR monomérica o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos aminoácidos 101-109 (SEQ ID NO:30) de TTR) son provistos por una variedad de técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos son seleccionados por experimentos de unión competitiva, por el método de presentación de fago de Winter, arriba, o de otra manera, tener la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en los ejemplos. Los anticuerpos humanos también pueden ser relevados en cuanto a especificidad de epítipo particular usando solo un fragmento de TTR, como una variante de TTR que contiene solo residuos aminoácidos 101-109 de TTR, como el antígeno diana, y/o relevando anticuerpos contra una colección de variantes de TTR, como variantes de TTR que contienen varias mutaciones dentro de los residuos aminoácidos 101-109 de TTR.

[0256] Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método trioma de Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Patent No. 4.634.664; y Engleman *et al.*, US Patent 4.634.666, uso de ratones transgénicos incluyendo genes de inmunoglobulinas

humanas (ver, por ejemplo, Lonberg *et al.*, WO 93/12227 (1993); US 5.877.397; US 5.874.299; US 5.814.318; US 5.789.650; US 5.770.429; US 5.661.016; US 5.633.425; US 5.625.126; US 5.569.825; US 5.545.806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); y Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) y métodos de presentación de fagos (ver, por ejemplo, Dower *et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; US 5.877.218; US 5.871.907; US 5.858.657; US 5.837.242; US 5.733.743; y US 5.565.332).

F. Selección de Región Constante

[0257] Las regiones variables de la cadena pesada y liviana de los anticuerpos quiméricos, revestidos o humanizados pueden ser unidas a al menos una porción de una región constante humana. La elección de región constante depende, en parte, si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento y los isotipos humanos IgG2 y IgG4 no. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras más fuertes mediadas por células que IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de cadena liviana pueden ser lambda o kappa. Las convenciones de numeración para las regiones constantes incluyen la numeración EU (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. EE.UU.*, 63, 78-85 (1969)), la numeración de Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), la numeración única IMGT (Lefranc M.-P. et al.), la numeración única IMGT para inmunoglobulina y dominios constantes de receptores de células T y dominios de tipo C de la superfamilia de Ig, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005), y numeración de exones IMGT (Lefranc, arriba).

[0258] Uno o varios aminoácidos en el amino o carboxi terminal de la cadena liviana y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o estar derivatizados en una proporción o en todas las moléculas. Las sustituciones pueden hacerse en las regiones constantes para reducir o incrementar la función efectora como la citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (ver, por ejemplo, Winter *et al.*, Patente US No. 5.624.821; Tso *et al.*, Patente US No. 5.834.597; y Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en seres humanos (ver, por ejemplo, Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Sustituciones a modo de ejemplo incluyen una Gln en posición 250 y/o una Leu en posición 428 (en este párrafo se usa la numeración de EU para la región constante) para incrementar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o todas las posiciones

234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (ver, por ejemplo, US 6.624.821). Puede usarse una sustitución de alanina en posiciones 234, 235, y 237 de IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Algunos anticuerpos tienen sustitución de alanina en posiciones 234, 235 y 237 de IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en IgG2 humana son sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina (ver, por ejemplo, US 5.624.821). En algunos anticuerpos, se usa una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, y 331 según numeración EU de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, se usa una mutación en una o más de las posiciones 318, 320, y 322 por numeración EU de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y/o 235 son sustituidas con alanina y/o la posición 329 es sustituida con glicina. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y 235 son sustituidas con alanina, como en SEQ ID NO:27. En algunos anticuerpos, el isotipo es IgG2 o IgG4 humanas.

[0259] Una región constante kappa de la cadena liviana humana a modo de ejemplo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24. La arginina N-terminal de SEQ ID NO:24 puede omitirse, en cuyo caso la región constante kappa de la cadena liviana tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25. Una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana a modo de ejemplo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (con o sin la lisina C-terminal). Los anticuerpos pueden ser expresados como tetrámeros que contienen dos cadenas livianas y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas livianas, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena simple en los que los dominios variables maduros de cadena pesada y liviana están vinculados a través de un espaciador.

[0260] Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre individuos, esto es, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes. Así, por ejemplo, otra región constante de cadena pesada es de alotipo de IgG1 G1m3 y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22. Otra región constante de cadena pesada del alotipo de IgG1 G1m3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23 (con o sin la lisina C-terminal). La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupan posiciones en alotipos naturales.

G. *Expresión de Anticuerpos Recombinantes*

[0261] Se conocen varios métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados usando una línea celular que expresa anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de inmunoglobulina de los anticuerpos pueden ser clonadas y secuenciadas usando métodos bien conocidos. En un método, la región variable VH de la cadena pesada se clona por RT-PCR usando ARNm preparado de células de hibridoma. Se utilizan cebadores consenso para el péptido líder de la región VH que incluye el codón de iniciación de la traducción como el cebador 5' y un cebador 3' específico de regiones constantes g2b. Cebadores a modo de ejemplo están descritos en la publicación de patente U.S. US 2005/0009150 por Schenk *et al.* (de aquí en adelante “Schenk”). Las secuencias de múltiples clones derivados independientemente pueden ser comparadas para asegurar que no se introduzcan cambios durante la amplificación. La secuencia de la región VH puede también ser determinada o confirmada mediante secuenciación de un fragmento VH obtenido por la metodología 5'RACE RT-PCR y el cebador específico 3' g2b.

[0262] La región variable VL de la cadena liviana puede ser clonada de manera análoga. En una aproximación, se diseña un conjunto de cebadores consenso para amplificación de las regiones VL usando un cebador 5' diseñado para hibridar a la región VL que incluye el codón de inicio de la traducción y un cebador específico 3' para la región Ck aguas abajo de la región de unión V-J. En una segunda aproximación, la metodología 5'RACE RT-PCR se utiliza para clonar una VL que codifica ADNc. Los cebadores a modo de ejemplo se describen en Schenk, arroba. Las secuencias clonadas luego se combinan con secuencias que codifican regiones constantes humanas (u otras especies no humanas). Secuencias a modo de ejemplo que codifican regiones constantes humanas incluye SEQ ID NO:32, que codifica una región constante de IgG1 humana, y SEQ ID NOs:33 y 34, que codifican una región constante de la cadena liviana kappa humana.

[0263] En una aproximación, las regiones variable de cadena pesada y liviana son rediseñadas para codificar secuencias dadoras de corte y empalme (*splice*) aguas abajo de las respectivas uniones VDJ o VJ y son clonadas en un vector de expresión de mamífero, tal como pCMV-hy1 para la cadena pesada y pCMV-Mcl para la cadena liviana. Estos vectores codifican las regiones constante $\gamma 1$ y Ck humanas como fragmentos exónicos aguas abajo del cassette de región variable insertado. Luego de la verificación de secuencia, los vectores de expresión de cadena pesada y cadena liviana pueden ser co-transfectados en células CHO para producir

anticuerpos quiméricos. El medio condicionado es recolectado 48 horas pos-transfección y analizado mediante análisis de Western blot para producción de anticuerpos o ELISA para unión de antígeno. Los anticuerpos quiméricos son humanizados como se describe anteriormente.

[0264] Los anticuerpos quiméricos, revestidos, humanizados, y humanos son típicamente producidos por expresión recombinante. Los constructos de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de expresión operablemente vinculada a las secuencias codificantes de las cadenas de anticuerpos, incluyendo los elementos naturalmente asociados o de control de expresión heteróloga, tal como un promotor. Las secuencias de control de expresión pueden ser sistemas de promotores en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucarióticas o procarióticas. Una vez que el vector ha sido incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene bajo condiciones adecuadas para alto nivel de expresión de las secuencias nucleotídicas y la colección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

[0265] Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos hospedadores tanto como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[0266] *E. coli* es un hospedador procariótico útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpo. Los microbios, tal como levaduras, también son útiles para expresión. *Saccharomyces* es una levadura hospedadora con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias terminadoras, y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores inducibles de levadura incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

[0267] Células de mamíferos pueden ser usadas para expresar segmentos de nucleótidos que codifican para inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Un número de líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas han sido desarrolladas, e incluyen líneas

celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, células HEK293, células L, y mielomas no productores de anticuerpo incluyendo Sp2/0 y NS0. Las células pueden ser no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de procesamiento de información necesarios, tal como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares. Ver Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0268] Alternativamente, las secuencias que codifiquen anticuerpos pueden ser incorporadas en transgenes para introducción en el genoma de un animal transgénico y subsecuente expresión en la leche del animal transgénico (ver, por ejemplo, U.S. 5.741.957; U.S. 5.304.489; y U.S. 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias que codifican para cadenas liviana y/o pesada operablemente vinculadas con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

[0269] Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés pueden ser transferidos a la célula hospedadora por métodos que dependen del tipo de célula hospedadora. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio es comúnmente utilizada para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística, o transfección basada en virus pueden ser usados para otros hospedadores celulares. Otros métodos usados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de *polybrene*, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección. Para producción de animales transgénicos, los transgenes puede ser microinyectados en oocitos fertilizados o pueden ser incorporados en el genoma de células madres embrionarias, y los núcleos de dichas células transferidos a oocitos enucleados.

[0270] Habiendo introducido el/los vector(es) que codifican para las cadenas pesada y liviana en un cultivo celular, los conjuntos celulares pueden ser relevados en cuanto productividad de crecimiento y calidad de producto en un medios libres de suero. Los conjuntos celulares de producción superior pueden ser luego sometidos a clonación de células individuales basada en FACS para generar líneas monoclonales. Pueden usarse productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de producto de más de 7,5 g/l de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también

pueden ser analizados en cuanto a turbidez, propiedades de filtración, PAGE, IEF, escaneo UV, HP-SEC, mapeo de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayo de unión, como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede luego ser depositado en un banco en múltiples viales y almacenado congelado para su uso posterior.

[0271] Una vez expresados, los anticuerpos pueden ser purificados de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo captura de proteína A, purificación por HPLC, cromatografía por columna, electroforesis en gel y similares (ver generalmente, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

[0272] La metodología para la producción comercial de anticuerpos puede ser utilizada, incluyendo optimización de codones, selección de promotores, selección de elementos de transcripción, selección de terminadores, clonado de células individuales libre de suero, depósito en bancos de células, uso de marcadores de selección para amplificación de número de copias, terminador CHO, o mejoramiento de títulos de proteínas (ver, ejemplo, US 5.786.464; US 6.114.148; US 6.063.598; US 7.569.339; WO 2004/050884; WO 2008/012142; WO2008/012142; WO 2005/019442; WO 2008/107388; WO 2009/027471; y US 5888809).

IV. Inmunógenos Activos

[0273] La invención también provee métodos para tratar o efectuar la profilaxis de una amiloidosis mediada por transtiretina en un sujeto, que comprende administrar un agente que induce una respuesta inmune que comprende anticuerpos contra TTR. El agente puede inducir anticuerpos por sí mismo y/o cuando está ligado a un portador y/o en presencia de un adyuvante. Dicho agente utilizado para la inmunización activa sirve para inducir en un paciente los mismos tipos de anticuerpos descritos anteriormente en conexión con inmunización pasiva. Algunos de dichos métodos incluye administrar a un sujeto un inmunógeno que comprende un epítipo al cual se une específicamente el anticuerpo 18C5 en un régimen efectivo para generar anticuerpo contra TTR. En algunos métodos, un inmunógeno comprende un péptido de TTR de hasta 20 aminoácidos contiguos de TTR al cual se une de modo específico el anticuerpo 18C5. En algunos métodos, el inmunógeno comprende un péptido de TTR de hasta 20 aminoácidos contiguos de los residuos 89-127 de TTR. En algunos métodos el inmunógeno comprende un péptido de TTR de hasta 11 aminoácidos contiguos de los residuos 100-110 de TTR. En algunos métodos el inmunógeno comprende un péptido de TTR de hasta 9 aminoácidos contiguos de los residuos 101-109 de TTR. En algunos métodos, el

epítoto peptídico de TTR consiste de 4-11 aminoácidos contiguos de los residuos 89-127 de TTR. En algunos métodos, el epítoto peptídico de TTR consiste en 4-11 aminoácidos contiguos de los residuos 100-110 de TTR. En algunos métodos, el epítoto peptídico consiste en 4-9 aminoácidos contiguos de los residuos 101-109 de TTR. Algunos péptidos de TTR utilizados como inmunógenos carecen del epítoto de célula T. Dichos péptidos están unidos a un portador heterólogo para suministrar un epítoto de célula T.

[0274] Para inducir anticuerpos que se unen al mismo epítoto o epítotos superpuestos que 18C5, la especificidad de epítoto de estos anticuerpos puede ser mapeada (por ejemplo, ensayando el enlace a una serie de péptidos superpuestos que abarcan TTR). Puede ser utilizado como inmunógeno un fragmento de TTR que consiste, que incluye o que se superpone al epítoto.

[0275] Opcionalmente, los péptidos de TTR están ligados a un portador heterólogo y/o son administrados en combinación con un adyuvante para cooperar a producir anticuerpos. El portador heterólogo y el adyuvante, si se utilizan, pueden ser el mismo que se utilizó para la generación del anticuerpo monoclonal, aunque pueden ser también seleccionados para una mejor aptitud farmacéutica para uso en seres humanos. Portadores adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulinas, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria (por ejemplo, CRM197), *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado atenuado de toxina. Los epítotos de células T son también moléculas portadoras adecuadas. Se pueden formar algunos conjugados mediante los agentes de unión de la invención a una molécula de polímero inmunoestimulador (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un polímero de manosa), o glucano (un polímero β 1→2), citoquinas (por ejemplo, IL-1, péptidos alfa IL-1 y β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF), y quimioquinas (por ejemplo, MIP1- α y β , y RANTES). Los inmunógenos pueden estar ligados a portadores con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly). Otros portadores incluyen partículas tipo virus. Las partículas tipo virus (VLPs) también llamadas pseudoviriones o partículas derivadas de virus, representan estructuras de subunidad compuestas por copias múltiples de una cápside viral y/o proteína de envoltura capaces de auto ensamblarse en VLPs de simetría esférica definida *in vivo*. (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415). Alternativamente, los inmunógenos peptídicos pueden estar ligados a al menos un epítoto de célula T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas Clase II de MHC, tal como el epítoto pan DR ("PADRE"). PADRE está descripto en US 5.736.142, WO 95/07707, y Alexander J et al,

Immunity, 1:751-761 (1994). Los inmunógenos activos pueden ser presentados en forma multimérica en donde copias múltiples de un inmunógeno y/o su portador están presentadas como una única molécula covalente.

[0276] Los fragmentos son administrados frecuentemente con adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El adyuvante aumenta el título de los anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de los anticuerpos inducidos en relación a la situación en la que el péptido fuera utilizado solo. Puede ser utilizada una variedad de adyuvantes en combinación con un fragmento de TTR inmunogénico para inducir una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (MPL™) (ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glicósido de triterpeno o saponina aislada a partir de la corteza del árbol de la Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en Sudamérica (ver Kensil *et al.*, en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; ahora Antigenics, Inc., New York, NY). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tal como escualeno o aceite de maní), opcionalmente en combinación con inmunoestimulantes, tales como lípido A monofosforilado (ver Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos, y micobacterias muertas. Los adyuvantes Ribi son emulsiones de aceite en agua. Ribi contiene un aceite metabolizable (escualeno) emulsionado con solución salina que contiene Twen 80. Ribi contiene también productos micobacterianos refinados que actúan como inmunoestimulantes y lípido A bacteriano monofosforilado. Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden ser administrados de forma separada, antes, junto con o después de la administración del agente terapéutico.

[0277] También pueden utilizarse análogos de fragmentos de TTR natural que inducen anticuerpos contra TTR. Por ejemplo, uno o más de todos los L-aminoácidos pueden ser sustituidos con D-aminoácidos en tales péptidos. También puede ser invertido el orden de los aminoácidos (retro péptido). Opcionalmente un péptido incluye todos los D-aminoácidos en orden inverso (péptido retro-inverso). Los péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similaridad significativa de secuencia de aminoácidos con péptidos de TTR pero que de todos modos sirven como péptidos miméticos de TTR e inducen una respuesta

inmune similar. También pueden ser utilizados anticuerpos anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonales para TTR como se describió más arriba. Tales anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmune al mismo (ver *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6ta ed., p. 181).

[0278] Los péptidos (y opcionalmente un portador fusionado al péptido) pueden también ser administrados en forma de un ácido nucleico que codifica el péptido y expresado *in situ* en un paciente. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está típicamente ligado a elementos reguladores, tales como un promotor y un potenciador que permite la expresión del segmento de ADN en las células diana de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, son adecuados para dirigir la expresión los elementos promotores y potenciadores de los genes de la cadena liviana o pesada de inmunoglobulinas o el promotor y potenciador tempranos intermediarios principales de CMV. Los elementos reguladores ligados y secuencias codificantes son clonados con frecuencia en un vector. Los anticuerpos pueden ser administrados también en la forma de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y/o liviana del anticuerpo. Si están presentes ambas cadenas pesada y liviana, las cadenas están ligadas preferiblemente como un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos para administración pasiva pueden ser preparados también por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad a partir de sueros de pacientes tratados con inmunógenos peptídicos.

[0279] El ADN puede ser suministrado en forma desnuda (es decir, sin materiales coloidales o encapsulados). De modo alternativo pueden ser utilizados una cantidad de sistemas de vectores virales que incluyen sistemas retrovirales (ver, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vectores adenovirales (ver, por ejemplo, Bett et al, *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)); vectores de virus adeno-asociados (ver, por ejemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia pox que incluye virus *vaccinia* y virus pox aviario, vectores virales del género alfa virus tales como aquellos derivados de Sindbis y Semliki Forest Viruses (ver, por ejemplo, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus de encefalitis equina de Venezuela (ver US 5.643.576) y rhabdovirus, tales como virus de estomatitis vesicular (ver WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

[0280] El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contiene, puede ser empaquetado en liposomas. Se describen lípidos y análogos relacionados en US 5.208.036,

US 5.264.618, US 5.279.833, y US 5.283.185. Los vectores y ADN que codifica un inmunógeno pueden estar también adsorbidos a, o asociados con, portadores particulados, ejemplos de los cuales incluyen polímero de polimetacrilato de metilo y polilactidas y poli(lactida-co-glicólidos), (ver, por ejemplo, McGee et al., J. Micro Encap. 1996).

H. *Ensayos de Relevamiento de Anticuerpos*

[0281] Los anticuerpos pueden ser sometidos a varios relevamientos incluyendo análisis de unión, relevamientos funcionales, relevamientos en modelos animales de enfermedades asociadas con depósitos de TTR, y ensayos clínicos. Los ensayos de unión evalúan unión específica y, opcionalmente, afinidad y especificidad de epítotope a TTR monomérica o un fragmento de la misma. Por ejemplo, los ensayos de unión pueden relevar anticuerpos que se unen a los residuos aminoácidos 101-109 (SEQ ID NO:30) de TTR, que es un epítotope que está escondido en el tetrámero nativo de TTR y expuesto en las formas monomérica, mal plegada, agregada o fibrilar de TTR. Los inmunógenos activos pueden, de modo similar ser relevados en cuanto a capacidad para inducir anticuerpos con dicha especificidad de unión. En este caso, un inmunógeno activo es utilizado para inmunizar un animal de laboratorio y ensayar el suero resultante en relación con la especificidad de unión apropiada. Los anticuerpos pueden también ser relevados en cuanto su capacidad para unirse a conformaciones pre-fibrilares, no nativas de TTR y fibrillas amiloides de TTR pero no conformaciones nativas de TTR. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser relevados en cuanto a la capacidad de unirse a formas monoméricas de TTR creadas por disociación o desagregación de TTR nativa tetramérica, y pueden ser contra-relevados frente a TTR nativa tetramérica, como se describe en los ejemplos o de otro modo. Del mismo modo, los anticuerpos pueden también ser relevados en cuanto a su inmunorreactividad en tejido de amiloidosis mediada por TTR pero no en tejido sano. Dichos relevamientos son a veces realizados en competencia con un anticuerpo a modo de ejemplo, tal como un anticuerpo que tenga las regiones variables de 18C5 o el isotipo kappa de IgG1. Opcionalmente, tanto el anticuerpo o diana de TTR es inmovilizado en dicho ensayo.

[0282] Los ensayos funcionales pueden ser realizados en modelos celulares incluyendo células que expresan naturalmente TTR o transfectadas con ADN que codifica para TTR o un fragmento de la misma. Las células adecuadas incluyen células derivadas de tejido cardíaco u otros tejidos afectados por amiloidogénesis por TTR. Las células pueden ser relevadas en cuanto a niveles reducidos de las formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de

TTR (por ejemplo, por Western blotting o inmunoprecipitación de extractos celulares o sobrenadantes) o toxicidad reducida atribuible a las formas monomérica, mal plegada, agregada o fibrilar de TTR. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser evaluados por la capacidad para inhibir o reducir la agregación de TTR, inhibir o reducir la formación de fibrillas de TTR, reducir los depósitos de TTR, eliminar la TTR agregada, o estabilizar conformaciones no tóxicas de TTR.

[0283] Otros ensayos funcionales pueden ser realizados en solución, tal como evaluar si un anticuerpo es capaz de interrumpir o reducir la formación de fibrillas de TTR cuando se ponen en contacto con el anticuerpo TTR monomérica o intermediarios de TTR mal plegada en solución. El alcance de la formación de fibrillas puede ser ensayado mediante mediciones de turbidez, por ejemplo, a 400 nm en un espectrómetro de UV-visible equipado con una unidad de control de temperatura. También puede ser usada Tioflavina-T para evaluar el alcance de la formación de fibrillas amiloides. Por ejemplo, un exceso molar de cinco veces de Tioflavina-T puede ser agregado a muestras de TTR y dejado a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de tomar las mediciones. La fluorescencia de Tioflavina-T puede ser monitoreada usando un espectrofluorómetro. Ver US 2014/0056904.

[0284] Los relevamientos de modelos animales evalúan la capacidad del anticuerpo o inmunógenos activos para tratar de forma terapéutica o profiláctica los signos o síntomas en un modelo animal que simula una enfermedad humana asociada con la acumulación de TTR o depósitos de TTR. Dichas enfermedades incluyen tipos de amiloidosis por TTR, tal como amiloidosis por ATTR de tipo salvaje (también llamada amiloidosis senil sistémica SSA), amiloidosis senil cardíaca (SCA), polineuropatía familiar amiloide (FAP), miocardiopatía familiar amiloide (FAC), y amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA). Signos o síntomas adecuados que pueden ser monitoreados incluyen la presencia y extensión de depósitos amiloides en varios tejidos, tal como el tracto gastrointestinal o corazón. Los inmunógenos activos también pueden ser ensayados en cuanto a inducción de anticuerpos en el suero. El alcance de la reducción de los depósitos amiloides puede ser determinado por comparación con un control apropiado, tal como el nivel de depósitos amiloides de TTR en animales control que han recibido un anticuerpo control (por ejemplo, un anticuerpo de control de isotipo coincidente) o un inmunógeno control, un placebo, o ningún tratamiento en absoluto. Un modelo animal a modo de ejemplo para evaluar la actividad contra la amiloidosis por TTR es un modelo de ratón que lleva una mutación nula en el locus endógeno de ratón *Ttr* y el gen

mutante humano *TTR* comprendiendo una mutación V30M que está asociada con polineuropatía amiloidótica familiar. Ver, ejemplo, Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso y Saraiva, *FASEB J* 20(2):234-239 (2006). Modelos similares también existen, incluyendo otros modelos para versiones familiares de amiloidosis por *TTR* y modelos para versiones esporádicas de amiloidosis por *TTR*. Ver, por ejemplo, Teng *et al.*, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito y Maeda, Mouse Models Transthyretin Amyloidosis, en *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions*, págs. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Los animales transgénicos pueden incluir el transgén humano de *TTR*, tal como el transgén de *TTR* con una mutación asociada con la amiloidosis por *TTR* o un transgén de *TTR* salvaje. Para facilitar la evaluación en modelos animales, pueden ser usados anticuerpos quiméricos que tengan una región constante apropiada para el modelo animal (por ejemplo, quimeras ratón-rata pueden ser usadas para evaluar anticuerpos en ratas). Se puede concluir que una versión humanizada de un anticuerpo será efectiva si el correspondiente anticuerpo de ratón o anticuerpo quimérico es efectivo en un modelo animal apropiado y el anticuerpo humanizado posee una afinidad de unión similar (por ejemplo, dentro del error experimental, tal como por un factor de 1,5, 2, o 3).

[0285] Los ensayos clínicos evalúan la seguridad y eficacia en un ser humano que tiene una enfermedad asociada con amiloidosis por *TTR*.

I. Ácidos Nucleicos

[0286] La invención también provee ácidos nucleicos que codifican para cualquiera de las cadenas pesada y liviana descritas anteriormente (por ejemplo, SEQ ID NOs: 2, 4, 18, y 20). Opcionalmente, dichos ácidos nucleicos además codifican un péptido señal y pueden ser expresados con el péptido señal enlazado a la región constante (por ejemplo, péptidos señal que posean las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs:35 (cadena pesada) y 37 (cadena liviana) que pueden ser codificados por las SEQ ID NOs:36 (cadena pesada) y 38 (cadena liviana), respectivamente. Las secuencias codificantes de ácidos nucleicos pueden estar operablemente ligadas con secuencias regulatorias para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tal como un promotor, potenciador, sitios de unión a ribosoma, señal de terminación de transcripción, y lo similar. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesada y liviana pueden presentarse en forma aislada o pueden ser clonados en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden ser sintetizados por, por ejemplo, síntesis en estado sólido o PCR por oligonucleótidos solapantes. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y

liviana pueden estar unidos como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, por ejemplo, cada uno clonado dentro de su propio vector de expresión.

J. Anticuerpos Conjugados

[0287] Los anticuerpos conjugados que se unen específicamente a antígenos expuestos en las formas patogénicas de TTR pero no en la forma nativa tetramérica de TTR, tal como los residuos aminoácidos 101-109 (SEQ ID NO:30) de TTR, son útiles para detectar la presencia de las formas monomérica, mal plegada, agregada, o fibrilar de TTR; monitoreando y evaluando la eficacia de los agentes terapéuticos que se usan para tratar pacientes diagnosticados con amiloidosis por TTR; inhibiendo o reduciendo la agregación de TTR; inhibiendo o reduciendo la formación de fibrillas de TTR; reduciendo o eliminando los depósitos de TTR; estabilizando conformaciones no tóxicas de TTR; o tratando o efectuando la profilaxis de una amiloidosis por TTR en un paciente. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden ser conjugados con otros grupos terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos, y/o marcadores detectables. Ver WO 03/057838; US 8.455.622.

[0288] Los grupos terapéuticos conjugados pueden ser cualquier agente que pueda usarse para tratar, combatir, aliviar, prevenir, o mejorar una condición no deseada o enfermedad en un paciente, tal como una amiloidosis por TTR. Los grupos terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, inmunomoduladores o cualquier agente biológicamente activo que facilite o aumente la actividad del anticuerpo. Un inmunomodulador puede ser cualquier agente que estimule o inhiba el desarrollo o mantenimiento de una respuesta inmunológica. Si dichos grupos terapéuticos están acoplados con un anticuerpo específico para las formas monomérica, mal plegada, agregada, o fibrilar de TTR, tal como los anticuerpos aquí descritos, los grupos terapéuticos acoplados van a tener una afinidad específica por formas no-nativas, patogénicas de TTR por sobre la forma nativa tetramérica de TTR. Consecuentemente, la administración de los anticuerpos conjugados tiene directamente como diana tejidos que comprenden formas patógenas de TTR con un mínimo daño al tejido normal, sano circundante. Esto puede ser particularmente útil para grupos terapéuticos que son demasiado tóxicos para ser administrados solos. Además, pueden ser usadas cantidades más pequeñas de los grupos terapéuticos.

[0289] Ejemplos de grupos terapéuticos adecuados incluyen drogas que reducen los niveles de TTR, estabilizan la estructura nativa tetramérica de TTR, inhiben la agregación de TTR,

interrumpen la formación de fibrillas de TTR o de amiloides, o contrarrestan la toxicidad celular. Ver, por ejemplo, Almeida y Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013); Ruberg y Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Johnson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 421(2-3):185-203 (2012, Ueda y Ando, *Translational Neurodegeneration* 3:19 (2014), y Hawkins *et al.* *Annals of Medicine* 47:625-638 (2015)). Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar conjugados a tafamidis, diflunisal, ALN-TTR01, ALNTTR02, oligonucleótidos antisentido tal como IONIS TTRRx (inotersen), siARNs tal como patisiran o revusiran, doxiciclina (doxi), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), Doxi-TUDCA, ciclodextrina (CyD), 4'-iodo-4'-deoxidoxorubicina (IDOX), galato de epigallocatequina (EGCG), curcumina, resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), o anticuerpos contra el componente P amiloide sérico (SAP). Otros grupos terapéuticos representativos incluyen otros agentes conocidos útiles para tratamiento, manejo, o mejora de una amiloidosis por TTR o síntomas de una amiloidosis por TTR. Ver, por ejemplo, Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013) para síntomas clínicos comunes de amiloidosis por TTR y agentes típicos usados para tratar esos síntomas.

[0290] Los anticuerpos también pueden estar acoplados con otras proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser acoplados con *Fynomers*. *Fynomers* son pequeñas proteínas de unión (por ejemplo, 7 kDa) derivadas del dominio de Fyn SH3 humano. Pueden ser estables y solubles, y pueden carecer de residuos cisteína y puentes disulfuro. *Fynomers* pueden ser modificadas por ingeniería para unirse a moléculas diana con la misma afinidad y especificidad que los anticuerpos. Son adecuadas para crear proteínas de fusión multi-específicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, *Fynomers* pueden estar fusionadas a los extremos N-terminal y/o C-terminal de anticuerpos para crear *FynomAbs* bi- y tri-específicos con diferentes arquitecturas. *Fynomers* pueden estar seleccionadas utilizando bibliotecas de *Fynomer* a través de tecnologías de relevamiento utilizando FACS, Biacore, y ensayos basados en células que permiten la eficiente selección de *Fynomers* con propiedades óptimas. Ejemplos de *Fynomers* están descritos en Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter *et al.*, *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner *et al.*, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); y Brack *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

[0291] Los anticuerpos aquí divulgados también pueden estar acoplados o conjugados a uno o más anticuerpos (por ejemplo, para formar anticuerpos heteroconjugados). Dichos otros anticuerpos pueden unirse a diferentes epítopes dentro de TTR o una porción de la misma o pueden unirse a un antígeno diana diferente. Dichos anticuerpos anti-TTR que se unen a epítopes de TTR diferentes de los de 18C5, pueden incluir anticuerpos como en la Tabla 3.

[0292] Los anticuerpos también pueden estar acoplados con un marcador detectable. Dichos anticuerpos pueden ser usados, por ejemplo, para diagnosticar una amiloidosis por TTR, para monitorear la progresión de una amiloidosis por TTR, y/o para evaluar la eficacia del tratamiento. Dichos anticuerpos son particularmente útiles para realizar dichas determinaciones en sujetos que tienen o son susceptibles a una amiloidosis por TTR, o en muestras biológicas apropiadas obtenidas de dichos sujetos. Los marcadores detectables representativos que pueden ser acoplados o vinculados a un anticuerpo declarados aquí incluyen varias enzimas, tal como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, eta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, como estreptavidina, avidina o biotina; materiales fluorescentes, tal como umbeliferona, *DyLight fluors*, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tal como luminol; materiales bioluminiscentes, tal como luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tal como itrio⁹⁰ (⁹⁰Y), *radiosilver-111*, *radiogold-199*, Bismuto²¹³, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, y ¹¹⁷Sn; varias metales que emiten positrones par uso en diversas tomografías de emisión de positrones; iones metálicos paramagnéticos no radioactivos; y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas a radioisótopos específicos. Los marcadores detectables representativos que pueden ser acoplados o unidos a un anticuerpo divulgados en la presente incluyen marcadores electroquimioluminiscentes, por ejemplo MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester (SULFO-TAG) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD).

[0293] La unión de radioisótopos a anticuerpos puede ser realizada con quelatos bifuncionales convencionales. Para unión de *radiosilver-111* y *radiogold-199*, se pueden usar enlazadores basados en azufre. Ver Hazra *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). La unión de radioisótopos de plata puede involucrar reducir la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para radioisótopos

tales como ^{111}In y ^{90}Y , se puede usar ibritumomab tiuxetan y reaccionará con tales isotopos para formar ^{111}In -ibritumomab tiuxetan y ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan, respectivamente. Ver Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Supl 1:S91-S95 (2001).

[0294] Los grupos terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos, y/o marcadores detectables pueden ser acoplados o conjugados, directa o indirectamente a través de un intermediario (por ejemplo, un enlazador), a un anticuerpo 18C5 murino, quimérico, revestido, o humanizado usando técnicas conocidas en el arte. Ver por ejemplo, Arnon *et al.*, "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "*Antibodies For Drug Delivery*," en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985); y Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores clivables y no clivables. Pueden ser utilizados diferentes enlazadores que liberan los grupos terapéuticos acoplados, proteínas, anticuerpos, y/o marcadores detectables bajo condiciones ácidas o reductores, en exposición a proteasas específicas, o bajo otras condiciones definidas.

V. Aplicaciones Terapéuticas

[0295] Los anticuerpos anteriores pueden ser usados para tratar o efectuar profilaxis de una enfermedad en un paciente que tiene o está en riesgo de la enfermedad mediada al menos en parte por transtiretina (TTR), y particularmente por las formas monomérica, mal plegada, agregada, o fibrilar de TTR. Pese a que una comprensión de mecanismo no es requerida para la práctica, se cree que cualquiera o todos de los mecanismos a continuación pueden contribuir al tratamiento de amiloidosis por TTR utilizando los anticuerpos anteriores: inhibición de agregación de TTR y formación fibrilar mediada por anticuerpo, estabilización de conformaciones no tóxicas de TTR mediada por anticuerpo (por ejemplo, formas tetraméricas), o eliminación de TTR agregada, TTR oligomérica, o TTR monomérica mediadas por anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-droga pueden tener mecanismos de acción adicionales determinados por el grupo conjugado.

[0296] Los anticuerpos son administrados en un régimen efectivo que significa una dosis, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el inicio, reduce la severidad, inhibe un mayor deterioro, y/o alivia al menos un signo o síntoma de un trastorno en tratamiento. Si un paciente ya está sufriendo de un trastorno, se puede referir al régimen como un régimen terapéuticamente efectivo. Si el paciente tiene un riesgo elevado del trastorno relativo a la población en general pero aún no está experimentando síntomas, se puede referir al régimen como un régimen profilácticamente efectivo. En algunas instancias, la eficacia terapéutica o profiláctica puede ser observada en un paciente individual en relación con controles históricos o experiencia pasada en el mismo paciente. En otras instancias, la eficacia terapéutica o profiláctica puede ser demostrada en una prueba preclínica o clínica en una población de pacientes tratados en relación con una población control de pacientes no tratados.

[0297] La frecuencia de administración depende de la vida media del anticuerpo en la circulación, la condición del paciente y la vía de administración entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral, o en intervalos irregulares en respuesta a cambios en la condición del paciente o progresión del trastorno que se está tratando. Una frecuencia a modo de ejemplo de administración intravenosa es entre semanal y trimestral sobre un curso continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para administración subcutánea, una frecuencia de dosificación a modo de ejemplo es diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

[0298] El número de dosis administrada depende de si el trastorno es agudo o crónico y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para trastornos agudos o exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, entre 1 y 10 dosis son a menudo suficientes. A veces una sola dosis en bolo, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede ser repetido por recurrencia de un trastorno agudo o exacerbación aguda. Para trastornos crónico, un anticuerpo puede ser administrado en intervalos regulares, por ejemplo, semanal, quincenal, mensual, trimestral, cada seis meses por al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

VI. Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Uso

[0299] Aquí se proporcionan varios métodos para diagnosticar, monitorear, tratar o efectuar profilaxis de enfermedades o condiciones mediadas al menos en parte por transtiretina (TTR),

y particularmente por las formas monomérica, mal plegada, agregada, o fibrilar de TTR (por ejemplo, amiloidosis por TTR). Ejemplos de dichas enfermedades incluyen amiloidosis familiar por TTR, tales como miocardiopatía familiar amiloide (FAC) o miocardiopatía o hipertrofia en atletas y otros sometidos a ejercicio aeróbico extremo, polineuropatía familiar amiloide (FAP), o amiloidosis selectiva del sistema nervioso central (CNSA), y amiloidosis esporádicas por TTR, tales como amiloidosis senil sistémica (SSA) o amiloidosis senil cardíaca (SCA). La amiloidosis por TTR también puede estar asociada como causa o resultado de varias enfermedades y condiciones caracterizadas por degeneración de tejido u órgano o trauma. La acumulación de depósitos de TTR contribuye a la disfunción del órgano o tejido asociado con la enfermedad o condición. Un ejemplo de dicha condición susceptible a tratamiento o profilaxis con los agentes de la presente y métodos, es estenosis espinal (Westermarck et al., Upsala J. Medical Sciences 119, 223-238 (2014) y Yanagisawa et al., Modern Pathology 28, 201-207 (2015). Otra enfermedad igualmente susceptible de tratamiento o profilaxis es osteoartritis (Takanashi et al., Amyloid 20, 151-155 (2013), Gu et al., Biomed & Biotechnol. 15, 92-99; Takinami et al., Biomarker Insights 8, 85-95 (2014); Akasaki et al., Arthritis Rheumatol. 67, 2097-2107 (2015). Otra enfermedad igualmente susceptible de tratamiento o profilaxis es artritis reumatoide (Clement et al., JCI Insight 1 epublish (2016). Otra enfermedad susceptible de tratamiento o profilaxis es artritis idiopática juvenil (Sharma et al., PLoS One 9, e93905; 1-12 (2014). Otra enfermedad susceptible de tratamiento o profilaxis es la degeneración macular relacionada con la edad (húmeda o seca). Otras clases de condiciones igualmente susceptible de tratamiento o profilaxis son trastornos de ligamento y tendón, tales como trastornos del manguito rotador (Sueyoshi et al., Human Pathol. 42, 1259-64 (2011).

[0300] Los anticuerpos descritos anteriormente pueden ser incorporados en una composición farmacéutica para uso en tratamiento o profilaxis de cualquiera de las enfermedades y condiciones anteriores. En general, un anticuerpo o composición farmacéutica que contiene un anticuerpo es administrada a un sujeto que la necesita. Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de amiloidosis por TTR pero que no muestren síntomas, así como pacientes que presentan síntomas actualmente. Algunos pacientes pueden ser tratados durante la etapa prodrómica de la amiloidosis por TTR.

[0301] Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas profilácticamente a individuos que posean un riesgo genético conocido de amiloidosis por TTR. Dichos individuos incluyen aquellos que tiene familiares que han experimentado dicha enfermedad, y aquellos

cuyo riesgo se determina por análisis genético o marcadores bioquímicos (por ejemplo, mutaciones en TTR asociadas con amiloidosis por TTR), incluyendo el uso de los métodos de diagnóstico aquí provistos. Por ejemplo, hay más de 100 mutaciones en el gen que codifica para TTR que han sido implicadas en amiloidosis por TTR. Ver, por ejemplo, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas y Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet y Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983).

[0302] Los individuos que sufren de amiloidosis por TTR pueden a veces ser reconocidos por las manifestaciones clínicas de la amiloidosis por TTR, incluyendo una o más de las siguientes: (1) historia familiar de enfermedad neuropática, especialmente asociada con falla cardíaca; (2) dolor neuropático o alteraciones sensoriales progresivas de etiología desconocida; (3) síndrome de túnel carpiano sin causa obvia, particularmente si es bilateral y requiere liberación quirúrgica; (4) trastornos en la motilidad gastrointestinal o disfunción de nervio autonómico de etiología desconocida (por ejemplo, disfunción eréctil, hipotensión ortostática, vejiga neurogénica); (5) enfermedad cardíaca caracterizada por paredes ventriculares engrosadas en ausencia de hipertensión; (6) bloqueo atrio-ventricular avanzado de origen desconocido, particularmente cuando está acompañado de un corazón engrosado; y (7) inclusiones de cuerpo vítreo del tipo algodón-lana. Ver Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). El diagnóstico definitivo de amiloidosis por TTR, sin embargo, típicamente se basa en biopsias de órganos diana, seguido de tinción histológica del tejido extirpado con el colorante específico para amiloide, rojo Congo. Si se observa una prueba positiva para amiloide, la identificación de TTR por tinción inmunohistoquímica y espectrometría de masas es realizada posteriormente para asegurar que la proteína precursora responsable de la formación amiloide es en efecto TTR. Para las formas familiares de las enfermedades, se necesita la demostración de una mutación en el gen que codifica para TTR antes de poder realizar un diagnóstico definitivo.

[0303] La identificación del sujeto puede ocurrir en un entorno clínico, o en otro lugar, tal como la casa del sujeto, por ejemplo, a través del propio uso del sujeto de un kit de autoevaluación. Por ejemplo, el sujeto puede ser identificado basándose en varios síntomas tales como neuropatía periférica (sensorial y motora), neuropatía autónoma, deterioro gastrointestinal, miocardiopatía, nefropatía, o deposición ocular. Ver Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). El sujeto también puede ser identificado por niveles aumentados de las formas no nativas de TTR en muestra de plasma del sujeto comparados con muestras control, como se describe en los ejemplos.

[0304] Según lo justifiquen la historia familiar, las pruebas genéticas, o el relevamiento médico de amiloidosis por TTR, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 60, o 70 años de edad). El tratamiento típicamente implica múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo y puede ser monitoreado mediante ensayo de anticuerpo o respuestas de células T o células B activadas a un agente terapéutico (por ejemplo, una forma truncada de TTR que comprende los residuos aminoácidos 101-109) a lo largo del tiempo. Si la respuesta disminuye, se indica una dosificación de refuerzo.

[0305] En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o un agente para inducir un anticuerpo o una composición farmacéutica del mismo es administrado a un sujeto susceptible a, o de otra manera en riesgo de una enfermedad (por ejemplo, amiloidosis por TTR) en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) efectivo para reducir el riesgo, aminorar la severidad, o retrasar el inicio de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, un anticuerpo o inmunógeno para inducir un anticuerpo es administrado a un sujeto que se sospecha sufre de, o que ya padece, una enfermedad (por ejemplo, amiloidosis por TTR) en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) efectivo para aminorar o al menos inhibir un mayor deterioro de al menos un signo o síntoma de la enfermedad.

[0306] Un régimen es considerado terapéuticamente o profilácticamente efectivo si un sujeto tratado individualmente alcanza un resultado más favorable que el resultado medio en una población control de sujetos comparables no tratados con los métodos descritos en la presente, o si un resultado más favorable es demostrado para un régimen en sujetos tratados versus sujetos control en un ensayo clínico controlado (por ejemplo, un ensayo fase II, fase II/III, o fase III) o un modelo animal en el nivel $p < 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$.

[0307] Un régimen efectivo de un anticuerpo puede ser utilizado para, por ej. inhibir o reducir la agregación de TTR en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una condición asociada con acumulación de TTR; inhibir o reducir la formación fibrilar de TTR en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una condición asociada con acumulación de TTR; reducir o eliminar depósitos de TTR o TTR agregada en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una condición asociada con acumulación de TTR; estabilizar conformaciones no tóxicas de TTR en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una condición asociada con acumulación de TTR; inhibir efectos tóxicos de agregados de TTR, fibrillas o depósitos en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una condición asociada con acumulación de TTR; diagnosticar la presencia o ausencia de acumulación amiloide de TTR en un tejido que se sospecha comprende la

acumulación amiloide; determinar un nivel de depósitos de TTR en un sujeto detectando la presencia de anticuerpo unido en el sujeto siguiendo a la administración del anticuerpo; detectar la presencia de formas monomérica, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en un sujeto; monitorear y evaluar la eficacia de agentes terapéuticos que están siendo utilizados para tratar pacientes diagnosticados con amiloidosis por TTR; inducir una respuesta inmune que comprende anticuerpos para TTR en un sujeto; demorar el comienzo de una condición asociada con acumulación amiloide de TTR en un sujeto; o tratar o efectuar la profilaxis de una amiloidosis por TTR en un paciente.

[0308] Las dosis efectivas varían dependiendo de muchos factores diferentes, tales como medios de administración, del sitio diana, estado fisiológico del sujeto, de si el sujeto es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

[0309] Un rango de dosis a modo de ejemplo para anticuerpos puede ser desde aproximadamente 0,1-20, o 0,5-5 mg/kg de peso corporal (por ej. 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg/kg) o 10-1500 mg como dosificación fija. La dosificación depende de la condición del paciente y respuesta a tratamientos previos, si existieran, de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y de si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

[0310] El anticuerpo puede ser administrado en dichas dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, o de acuerdo con cualquier otro cronograma determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento a modo de ejemplo comprende la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, al menos seis meses. Ejemplos adicionales de regímenes de tratamiento comprenden administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

La cantidad de un agente para administración activa varía desde 0,1-500 μ g por paciente y más usualmente desde 1-100 o 1-10 μ g por inyección para administración humana. La dosificación se refiere al peso de agente activo para inmunización sin incluir ningún portador al cual esté ligado para ayudar a producir una respuesta inmune. El cronograma de las inyecciones puede variar significativamente desde una vez al día, hasta una vez al año, hasta una vez en una década. Un régimen típico comprende una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo tales como intervalos de seis semanas o dos meses. Otro régimen comprende una inmunización seguida por inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde.

Otro régimen comprende una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser en una base irregular según lo indique el monitoreo de la respuesta inmune.

[0311] Los anticuerpos o agentes para inducir anticuerpos pueden ser administrados mediante rutas periféricas. Las rutas de administración incluyen tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Las rutas de ejemplo para administración de anticuerpos pueden ser intravenosas o subcutáneas. Las rutas de ejemplo para inmunización activa son subcutánea e intramuscular. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, mediante infusión durante un período tal como 30-90 min. Este tipo de inyección, lo más típicamente es llevada a cabo en los músculos del brazo o de la pierna. En algunos métodos, los agentes son inyectados directamente dentro del tejido particular donde se han acumulado los depósitos, por ejemplo inyección intracraneal.

[0312] Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral pueden ser estériles y sustancialmente isotónicas (250-350 mOsm/kg de agua) y fabricadas en condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden ser provistas en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis para una única administración). Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la ruta de administración elegida. Para inyección, los anticuerpos pueden ser formulados en soluciones acuosas, por ej. en buffers fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o solución salina o buffer acetato fisiológicos (para reducir la incomodidad en el sitio de inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para reconstitución con un vehículo adecuado, por ej. agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

[0313] Los regímenes pueden ser administrados en combinación con, concomitantemente con, o secuencialmente con otro agente efectivo en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad que está siendo tratada. Dichos agentes pueden incluir siARN para inhibir la expresión de TTR o Vyndaqel, un estabilizante de TTR en la formación de tetrámeros. Dichos agentes pueden incluir estabilizadores de tetrámeros de TTR tales como tafamidis o diflunisal (ver, por ej. WO 2011/116123, patente US 9.150.489), terapias génicas para suprimir la expresión de TTR tal como oligonucleótidos antisentido tales como IONIS-TTRRx (inotersen) (ver por ej. patentes US 8.101.743, 8.697.860, 9.061.044, y 9.399.774; patente JP 5896175) o siARN tales como

patisiran o revusiran (ver por ej. WO 2016/033326), compuestos degradadores de amiloide tales como doxiciclina (doxi), ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), Doxy-TUDCA, ciclodextrina (CyD), 4'-iodo-4'-desoxidoxorubicina (IDOX) o anticuerpos para el componente P de amiloide sérico (SAP).

[0314] Otro agente efectivo en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad a ser tratada puede ser administrado a un sujeto que ha sido tratado previamente con un anticuerpo descrito en la presente. El sujeto tratado con otro agente efectivo en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad a ser tratada puede ya no estar recibiendo tratamiento con otro anticuerpo descrito en la presente.

[0315] El tratamiento con anticuerpos descrito en la presente puede ser combinado con otros tratamientos efectivos contra el trastorno a ser tratado. Los tratamientos de combinación pueden ser formulados en conjunto o administrados separadamente. Algunos ejemplos de tratamientos útiles para terapias de combinación incluyen un segundo anticuerpo anti-TTR que se une a un epítipo diferente de aquel de 18C5, por ejemplo un anticuerpo como se describe en la Tabla 3.

[0316] Después del tratamiento, la condición del sujeto puede ser evaluada para determinar el progreso o eficacia de dicho tratamiento. Dichos métodos preferiblemente evalúan los cambios en niveles de amiloide por TTR o niveles de formas no nativas de TTR. Por ejemplo, los niveles de amiloide por TTR pueden ser evaluados para determinar mejora relativa en los niveles de amiloide por TTR en el sujeto bajo circunstancias comparables antes del tratamiento. Los niveles de amiloide por TTR del sujeto pueden también ser comparados con poblaciones control bajo circunstancias comparables. Las poblaciones control pueden estar afectadas de manera similar, sujetos no tratados o sujetos no tratados normales (entre otros sujetos de control). La mejora en relación con sujetos no tratados, afectados de manera similar o niveles que se aproximan o alcanzan los niveles en sujetos normales no tratados indica una respuesta positiva al tratamiento.

[0317] Los niveles amiloides por TTR pueden ser medidos mediante una cantidad de métodos, incluyendo técnicas por imágenes. Los ejemplos de técnicas por imagen incluyen escaneo por PET con TTR radiomarcada o fragmentos de la misma, anticuerpos TTR o fragmentos de los mismos, agentes para imágenes amiloide en base a rojo Congo, tales como, por ej. PIB (US 2011/0008255), péptido 31 para imágenes de amiloide (*Biodistribution of amiloide-imaging*

peptide, p31, correlates with amyloid quantitation base don Congo red tissue staining, Wall et al., Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting), y otras etiquetas PET. Los niveles de formas no nativas de TTR pueden ser medidos, por ejemplo, llevando a cabo ensayos SDS-PAGE/Western blot o en placa Meso Scale Discovery con los anticuerpos descritos en la presente sobre muestras de plasma o muestras de biopsia de un sujeto y comparando con muestras control, como se describe en los ejemplos.

A. Métodos de Diagnóstico y Monitoreo

[0318] También se proveen métodos para detectar una respuesta inmune contra TTR en un paciente que sufre de, o es susceptible de, enfermedades asociadas con deposición de TTR o formas patogénicas de TTR (por ej. formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR). Los métodos pueden ser utilizados para monitorear el curso de un tratamiento terapéutico y profiláctico con los agentes provistos en la presente. El perfil del anticuerpo luego de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpo seguido por una caída exponencial. Sin una dosis adicional, la caída se aproxima a los niveles pre-tratamiento dentro de un período de días a meses dependiendo de la vida media del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

[0319] En algunos métodos, se realiza una medición de línea de base del anticuerpo para TTR en el sujeto antes de la administración, una segunda medición es realizada enseguida de la misma para determinar el nivel pico del anticuerpo, y una o más mediciones adicionales son realizadas a intervalos para monitorear la caída de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo ha declinado hasta la línea de base o un porcentaje predeterminado del pico menos línea de base (por ej. 50%, 25% o 10%), se administra una dosis adicional de anticuerpo. En algunos métodos, los niveles pico o subsiguientes medidos menos el fondo son comparados con niveles de referencia previamente determinados para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros sujetos. Si el nivel medido de anticuerpo es significativamente menor que un nivel de referencia (por ej. menos que la media menos uno o, preferiblemente, dos desviaciones estándar del valor de referencia en una población de sujetos que se benefician del tratamiento) se indica la administración de una dosis adicional de anticuerpo.

[0320] También se proveen métodos para detectar formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en un sujeto, por ejemplo midiendo amiloide por TTR o formas patogénicas de TTR (por ej. formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR) en una muestra de un sujeto o por técnicas de imágenes *in vivo* de TTR en un sujeto. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de enfermedades asociadas con dichas formas patogénicas de TTR (por ej. amiloidosis por TTR) o la susceptibilidad a las mismas. Los métodos pueden también ser utilizados en sujetos asintomáticos. La presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR indica susceptibilidad a una futura enfermedad sintomática. Los métodos son también útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o respuesta a tratamiento en sujetos que han sido diagnosticados previamente con amiloidosis por TTR.

[0321] Muestras biológicas obtenidas a partir de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o en riesgo de tener una amiloidosis por TTR pueden ser puestas en contacto con los anticuerpos divulgados en la presente para evaluar la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR. Por ejemplo, los niveles de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en dichos sujetos pueden ser comparados con aquellos presentes en sujetos saludables. Alternativamente, los niveles de amiloide de TTR o formas patogénicas de TTR (por ej. formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR) en dichos sujetos que reciben tratamiento para la enfermedad pueden ser comparados con aquellos de sujetos que no han sido tratados por amiloidosis por TTR. Algunos de dichos ensayos involucran una biopsia de tejido obtenido de dichos sujetos. Pueden utilizarse ensayos ELISA, por ejemplo, para evaluar los niveles de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en muestras de fluidos. Algunos de dichos ensayos ELISA involucran anticuerpos anti-TTR que preferiblemente se unen a formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en relación con la forma tetramérica nativa de TTR.

[0322] Algunos de dichos ensayos son inmunoensayos sándwich. Algunos de dichos inmunoensayos emplean la plataforma de electroquimioluminiscencia Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Algunos de dichos ensayos utilizan marcas electroquimioluminiscentes en anticuerpos reporteros, por ej. MSD Assays (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Por ejemplo, el anticuerpo reportero puede ser marcado con una marca SULFO-TAG ((Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Las placas útiles en ensayos electroquimioluminiscentes pueden incorporar electrodos (por ej. placas MSD (Meso Scale

Diagnostics, Rockville, MD). Las placas útiles en ensayos electroquimioluminiscentes pueden incorporar electrodos en el fondo de cada pocillo (por ej. placas MSD (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Algunos ensayos emplean un anticuerpo de captura marcado. Por ejemplo, el anticuerpo de captura marcado puede ser 18C5 o una variante humanizada, quimérica, o revestida del mismo. Algunos ensayos emplean un anticuerpo reportero marcado. Por ejemplo, el anticuerpo reportero marcado puede ser 18C5 o una variante humanizada, quimérica o revestida del mismo. El anticuerpo reportero marcado puede ser también un anticuerpo de la Tabla 3 o una variante humanizada, quimérica o revestida del mismo. El anticuerpo reportero marcado puede ser un anticuerpo que se une a TTR sin especificidad conformacional. En una forma de realización, el anticuerpo que se une a TTR sin especificidad conformacional puede ser 8C3 o 7G7 o una variante humanizada, quimérica o revestida del mismo (ver por ej. WO 2016/120811). En una forma de realización, el anticuerpo que se une a TTR sin especificidad conformacional puede ser un anticuerpo policlonal. En una forma de realización, el anticuerpo policlonal es una prealbúmina policlonal anti-humana de conejo (Cat. No. A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA). En una forma de realización, el anticuerpo anti-TTR policlonal de conejo es Sigma, Catálogo No. HPA002550 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

[0323] Algunos ensayos detectan toda la TTR mal plegada en una muestra (es decir todas las formas mal plegadas de TTR que incluyen monómeros y multímeros). Otros ensayos detectan específicamente TTR mal plegada monomérica o TTR mal plegada multimérica. Otros ensayos detectan todas las formas de TTR (formas mal plegadas y forma tetramérica nativa). Algunos de dichos ensayos emplean un anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítipo diferente de TTR; en donde si está presente TTR mal plegada en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich, y en donde la detección del anticuerpo reportero que se une a la TTR mal plegada, si hubiere, indica la presencia o ausencia de todas las formas mal plegadas de TTR presentes en la muestra. Dichos anticuerpos reporteros pueden incluir 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, o una versión quimérica o una versión humanizada de los mismos. Dichos anticuerpos reporteros pueden incluir un anticuerpo que se une dentro de los residuos 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, o 115-127 de TTR. Dichos anticuerpos

reporteros pueden incluir 8C3 o 7G7 (ver por ej. WO 2016/120811). Dichos anticuerpos reporteros pueden incluir una prealbúmina anti-humana policlonal de conejo (Cat. No. A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA) o un anticuerpo policlonal anti-TTR de conejo (Sigma, Catálogo No. HPA002550, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

[0324] Algunos ensayos detectan formas multiméricas o TTR mal plegada en una muestra. Dichos ensayos pueden estar configurados para detectar TTR mal plegada multimérica preferencialmente o exclusivamente en TTR mal plegadas monoméricas. Algunos de dichos ensayos emplean un anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR. Dicha combinación de anticuerpos de captura y reportero pueden unirse preferencialmente o exclusivamente a TTR multimérica respecto de la monomérica porque las múltiples copias de TTR proveen múltiples epítopes para la unión del anticuerpo. La detección de la unión del anticuerpo reportero a TTR mal plegada multimérica, si hubiere, indica la presencia o ausencia de la TTR mal plegada multimérica. En algunos de dichos ensayos, el anticuerpo reportero compite por la unión a TTR con el anticuerpo de captura y/o el anticuerpo reportero y de captura de unen al mismo epítipo, o epítipo superpuesto, de TTR. En algunos de dichos ensayos, el anticuerpo de captura se une a una primera molécula de TTR mal plegada en la TTR mal plegada multimérica, y el anticuerpo reportero se une a una segunda molécula de TTR mal plegada en la TTR mal plegada multimérica. La competencia por la unión entre los anticuerpos de captura y reportero impide o al menos reduce (dependiendo de si la competencia es el resultado de superposición de epítopes o impedimento estérica) la unión simultánea y detección de TTR mal plegada monomérica. En algunos de dichos ensayos, la detección de la unión del anticuerpo reportero que se une a la segunda molécula de TTR mal plegada en la TTR multimérica indica la presencia o ausencia de TTR mal plegada multimérica.

[0325] Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser utilizados en un método para determinar una proporción del nivel de transtiretina (TTR) mal plegada multimérica total en relación con el nivel de TTR mal plegada total en una muestra biológica. Una primera porción de una muestra biológica puede ser ensayada para toda la TTR mal plegada en una muestra (es decir todas las formas mal plegadas de TTR que incluyen monómeros y multímeros) en un primer ensayo en donde se detectan las TTR mal plegadas monoméricas y mal plegadas multiméricas. El primer ensayo puede emplear un anticuerpo de captura que se une

específicamente a un epítoto dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítoto diferente de TTR. Si está presente TTR mal plegada en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich. La detección del anticuerpo reportero que se une a la TTR mal plegada, si hubiere, indica la presencia o ausencia de la TTR mal plegada en la muestra. Una segunda porción de una muestra biológica puede ser ensayada en cuanto a formas multiméricas de TTR mal plegada una muestra biológica en un segundo ensayo que detecta TTR mal plegada multimérica preferencialmente respecto a TTR mal plegada monomérica. El segundo ensayo puede emplear un anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítoto dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítoto dentro de los residuos 101-109 de TTR. Si está presente en la muestra TTR mal plegada multimérica, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada multimérica formando un complejo sándwich. El anticuerpo de captura y el reportero pueden unirse simultáneamente preferencialmente o exclusivamente a la TTR mal plegada multimérica, si hubiere, para indicar la presencia o ausencia de la TTR mal plegada multimérica. En algunos de dichos ensayos, el anticuerpo reportero compite por la unión a TTR con el anticuerpo de captura o se une al mismo epítoto o un epítoto superpuesto que el anticuerpo de captura. En alguno de dichos ensayos, el anticuerpo de captura se une a una primera molécula de TTR mal plegada en la TTR mal plegada multimérica, y el anticuerpo reportero se une a una segunda molécula de TTR mal plegada en la TTR mal plegada multimérica. La competencia por la unión entre los anticuerpos de captura y reportero impide o al menos reduce (dependiendo de si la competencia es el resultado de epítopos superpuestos o impedimento estérico) la unión y detección simultánea de TTR mal plegada monomérica. En algunos de dichos ensayos, la detección de la unión del anticuerpo reportero que se une a la segunda molécula de TTR mal plegada en la TTR multimérica indica la presencia o ausencia de TTR mal plegada multimérica. En algunos ensayos, se calcula una proporción de TTR mal plegada multimérica en relación con toda la TTR mal plegada.

[0326] Los anticuerpos descritos en la presente pueden también ser utilizados en un método para determinar una proporción del nivel de toda la TTR mal plegada en relación con la TTR total (formas mal plegadas y forma tetramérica nativa) en una muestra biológica. Una primera porción de una muestra biológica puede ser ensayada en cuanto a toda la TTR mal plegada en una muestra (es decir, todas las formas mal plegadas de TTR incluyendo monómeros y multímeros), en un primer ensayo en donde se detecta TTR mal plegada monomérica y mal

plegada multimérica. El primer ensayo puede emplear un anticuerpo de captura que se une específicamente a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR y un anticuerpo reportero que se une específicamente a un epítipo diferente de TTR. Si está presente TTR mal plegada en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR mal plegada formando un complejo sándwich. La detección del anticuerpo reportero unido a la TTR mal plegada, si hubiere, indica la presencia o ausencia de la TTR mal plegada en la muestra. Una segunda porción de una muestra biológica puede ser ensayada en cuanto a TTR total (formas mal plegadas y forma tetramérica nativa) en un segundo ensayo en donde se detecta la TTR total. El segundo ensayo puede emplear un anticuerpo de captura que se une a TTR sin especificidad conformacional y un anticuerpo reportero que se une a TTR sin especificidad conformacional. Si TTR está presente en la muestra, el anticuerpo de captura y el anticuerpo reportero se unen a la TTR formando un complejo sándwich. La detección del anticuerpo reportero unido a TTR, si hubiere, indica la presencia o ausencia de TTR presente en la muestra. Puede calcularse una proporción de toda la TTR mal plegada en relación con la TTR total (formas mal plegadas y forma tetramérica nativa).

[0327] Los métodos por imágenes *in vivo* pueden funcionar administrando un reactivo, tal como un anticuerpo que se une a formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en el sujeto, y luego detectar el reactivo después que se ha unido. Tales anticuerpos típicamente se unen a un epítipo dentro de los residuos 101-109 de TTR. Si se desea, la respuesta de eliminación (*clearing*) puede ser evitada utilizando fragmentos de anticuerpo que carecen de una región constante de longitud completa, tal como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir tanto para tratamiento como reactivo de diagnóstico.

[0328] Los reactivos de diagnóstico pueden ser administrados mediante inyección intravenosa en el cuerpo del sujeto, o mediante otras rutas consideradas razonables. La dosis de reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo es marcado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad para formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR no está marcado y se utiliza un agente de marcado secundario para unirse al reactivo primario. La elección de la marca depende de los medios de detección. Por ejemplo, una marca fluorescente es adecuada para detección óptica. El uso de marcas paramagnéticas es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las marcas radioactivas también pueden ser detectadas utilizando PET o SPECT.

[0329] El diagnóstico es llevado a cabo comparando el número, tamaño, y/o intensidad de los loci marcados con los valores de línea de base correspondientes. Los valores de línea de base pueden representar los niveles medios en una población de individuos sin enfermedad. Los valores de línea de base también pueden representar niveles previos determinados en el mismo sujeto. Por ejemplo, los valores de línea de base pueden ser determinados en un sujeto antes de comenzar el tratamiento, y comparar los valores medidos a partir de allí con los valores de línea de base. Una disminución en los valores en relación con la línea de base generalmente señala una respuesta positiva al tratamiento.

[0330] El monitoreo de los cambios en cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina, unión de anticuerpo anti-TTR o lo similar permite ajustar el régimen de tratamiento en respuesta al tratamiento. Entonces puede realizarse una determinación sobre el ajuste del tratamiento y si se desea el tratamiento puede ser ajustado en respuesta al monitoreo. Un cambio significativo significa que la comparación del valor de un parámetro después del tratamiento en relación con la línea de base provee alguna evidencia de que el tratamiento ha dado por resultado o no un efecto beneficioso. En algunas instancias, un cambio de valores de un parámetro en un paciente en sí mismo provee evidencia de que el tratamiento ha dado por resultado o no un efecto beneficioso. En otras instancias, el cambio de valores, si hubiere, en un paciente, es comparado con el cambio de valores, si hubiere, en una población de pacientes control representativos que no están sometidos a tratamiento. Una diferencia en respuesta en un paciente particular desde la respuesta normal en el paciente control (por ej. media más varianza de una desviación estándar) también puede proveer evidencia de que un régimen de tratamiento está o no alcanzando un efecto beneficioso en un paciente. Los cambios en los parámetros de TTR anteriores pueden también ser combinados con otro(s) cambio(s) en signos o síntomas tales como efectos secundarios en la determinación de si corresponde y cómo ajustar el tratamiento.

[0331] En algunos pacientes, el monitoreo indica que la cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina, o unión de anticuerpo anti-TTR es la misma o mayor que la detectada previamente. En dichos pacientes, si no hay efectos secundarios no aceptables, el régimen de tratamiento puede ser continuado como tal o incluso aumentado en frecuencia de administración y/o dosis si no está ya a la dosis máxima recomendada.

[0332] En algunos pacientes, el monitoreo indica una declinación detectable en la cantidad de TTR mal plegada, TTR multimérica mal plegada, depósitos de transtiretina, unión de anticuerpo anti-TTR o lo similar, pero que esa cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR permanece por encima de lo normal. En dichos pacientes, si no hay efectos secundarios no aceptables, el régimen de tratamiento puede ser continuado como tal o incluso incrementado en frecuencia de administración y/o dosis si no está ya a la máxima dosis recomendada. Alternativamente, en algunos de dichos pacientes, el régimen de tratamiento puede ser discontinuado y reemplazado con tratamiento con otros agentes, tales como estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico de base oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico de base ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico.

[0333] Si el monitoreo indica que una cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina, unión de anticuerpo anti-TTR o lo similar en un paciente se ha reducido a, o cerca de, un nivel normal de cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada monomérica, depósitos de transtiretina, o cantidad de unión de anticuerpo anti-TTR, el régimen de tratamiento puede ser ajustado desde uno de inducción (es decir que reduce el nivel de la cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina, o unión de anticuerpo anti-TTR) hasta uno de mantenimiento (es decir que mantiene la cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina, o unión de anticuerpo anti-TTR a un nivel aproximadamente constante). Dicho régimen puede ser efectuado reduciendo la dosis y/o frecuencia de administración del tratamiento. Alternativamente, en algunos de dichos pacientes, el régimen de tratamiento puede ser discontinuado y reemplazado con tratamiento con otros agentes, tales como un estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico de base oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico de base ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico.

[0334] En otros pacientes, el monitoreo puede indicar que el régimen de tratamiento está teniendo algún efecto beneficioso pero un efecto sub-óptimo. Un efecto óptimo puede ser definido como una reducción porcentual en la cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR dentro de la mitad o cuarto superior del cambio en cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR experimentado por una muestra

representativa de pacientes bajo el régimen de tratamiento en un dado punto de tiempo después del comienzo de la terapia. Un paciente que experimenta una declinación menor o un paciente cuya cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR permanece constante o incluso aumenta pero en un grado menor que el esperado en ausencia del régimen de tratamiento (por ej. como se infiere a partir de un grupo de control de pacientes al que no se les administró el régimen de tratamiento) puede ser clasificado como que experimenta una respuesta positiva pero sub-óptima. Tales pacientes pueden opcionalmente ser sometidos a un ajuste del régimen en el cual se aumenta la dosis y/o la frecuencia de administración de un agente. Alternativamente, o adicionalmente, si el ajuste hacia arriba no da por resultado una respuesta mejorada, en algunos de dichos pacientes, el régimen de tratamiento puede ser discontinuado y reemplazado con tratamiento con otros agentes, tales como un estabilizador del tetrámero de TTR, un agente terapéutico de base oligonucleótido antisentido, un agente terapéutico de base ARN de interferencia (ARNi) o doxiciclina más ácido tauroursodesoxicólico.

[0335] En algunos pacientes, la cantidad de TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR puede aumentar de manera similar o mayor a TTR mal plegada, TTR mal plegada multimérica, depósitos de transtiretina o unión de anticuerpo anti-TTR en pacientes que no reciben tratamiento. Si dicho incremento persiste en un período de tiempo, el tratamiento puede ser discontinuado, si se desea, en favor de un tratamiento con uno o más de otros agentes.

[0336] Los métodos de diagnóstico con anticuerpos descritos en la presente pueden ser llevados a cabo en combinación con un segundo anticuerpo anti-TTR que se une a un epítipo diferente de aquel de 18C5, por ejemplo un anticuerpo como se describe en la Tabla 3.

[0337] También se proveen métodos para distinguir una amiloidosis mediada por transtiretina de una amiloidosis no-TTR, por ej. amiloidosis de amiloide de cadena liviana (AL), también conocida como amiloidosis sistémica primaria.

IX. Kits

[0338] La invención provee además kits (por ej. contenedores) que comprenden los anticuerpos 18C5 humanizados descritos en la presente y materiales relacionados, tales como instrucciones para uso (por ej. inserto en el envase). Las instrucciones para uso pueden contener, por ejemplo, instrucciones para administración de los anticuerpos y opcionalmente

uno o más agentes adicionales. Los contenedores de anticuerpos pueden ser de dosis unitarias, envases a granel (por ej. envases multi-dosis) o dosis sub-unitarias.

[0339] El inserto en el envase se refiere a instrucciones usualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que conciernen al uso de dichos productos terapéuticos.

[0340] Los kits también pueden incluir un segundo contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También pueden incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

X. Otras Aplicaciones

[0341] Los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de transtiretina (TTR), o fragmentos de las mismas, en el contexto de diagnóstico o tratamiento clínicos o en investigación. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en una muestra biológica como una indicación de que la muestra biológica comprende depósitos amiloides por TTR. La unión de los anticuerpos a la muestra biológica puede ser comparada con la unión de los anticuerpos a una muestra de control. La muestra de control y la muestra biológica pueden comprender células del mismo tejido de origen. Las muestras de control y muestras biológicas pueden ser obtenidas del mismo individuo o de diferentes individuos y en la misma ocasión o en diferentes ocasiones. Si se desea, múltiples muestras biológicas y múltiples muestras control son evaluadas en múltiples ocasiones para proteger contra variaciones aleatorias independientes de las diferencias entre las muestras. Una comparación directa puede entonces ser realizada entre la(s) muestra(s) biológica(s) y la(s) muestra(s) control para determinar si la unión del anticuerpo (es decir la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR) a la(s) muestra(s) biológica(s) está aumentada, disminuida o es la misma en relación con la unión del anticuerpo a la(s) muestra(s) control. La unión aumentada del anticuerpo a la(s) muestra(s) biológica(s) en relación con la(s) muestra(s) control indica la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en la(s) muestra(s) biológica(s). En algunas instancias, la unión incrementada

del anticuerpo es estadísticamente significativa. Opcionalmente, la unión del anticuerpo a la muestra biológica es de al menos 1,5-veces, 2-veces, 3-veces, 4-veces, 5-veces, 10-veces, 20-veces, o 100-veces mayor que la unión del anticuerpo a la muestra control.

[0342] Además, los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en una muestra biológica para monitorear y evaluar la eficacia de un agente terapéutico que está siendo utilizado para tratar un paciente diagnosticado con amiloidosis por TTR. Una muestra biológica de un paciente diagnosticado con una amiloidosis por TTR es evaluado para establecer una línea de base para la unión de los anticuerpos a la muestra (es decir una línea de base para la presencia de las formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR en la muestra) antes de comenzar la terapia con el agente terapéutico. En algunas instancias, múltiples muestras biológicas del paciente son evaluadas en múltiples ocasiones para establecer tanto una línea de base como una medida de variaciones aleatorias independientes del tratamiento. Un agente terapéutico es entonces administrado en un régimen. El régimen puede incluir múltiples administraciones del agente durante un período de tiempo. Opcionalmente, la unión de los anticuerpos (es decir la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR) es evaluada en múltiples ocasiones en múltiples muestras biológicas del paciente, tanto para establecer una medida de variaciones aleatorias como para mostrar una tendencia en respuesta a inmunoterapia. Las diversas evaluaciones de la unión del anticuerpo a las muestras biológicas son entonces comparadas. Si solo se realizan dos evaluaciones, puede realizarse una comparación directa entre las dos evaluaciones para determinar si la unión del anticuerpo (es decir la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR) ha aumentado, disminuido o permanece igual entre las dos evaluaciones. Si se realizan más de dos mediciones, las mediciones pueden ser analizadas como un curso de tiempo que parte antes del tratamiento con el agente terapéutico y procede a lo largo del curso de la terapia. En pacientes para los cuales la unión del anticuerpo a muestras biológicas ha disminuido (es decir la presencia de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR), puede concluirse que el agente terapéutico fue efectivo en el tratamiento de amiloidosis por TTR en el paciente. La disminución de la unión del anticuerpo puede ser estadísticamente significativa. Opcionalmente, la unión disminuye en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100%. Las evaluaciones de la unión del anticuerpo pueden ser realizadas en conjunto con la evaluación de otros signos y síntomas de amiloidosis por TTR.

[0343] Los anticuerpos también pueden ser utilizados como reactivos de investigación para investigación en laboratorio para detectar formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR, o fragmentos de las mismas. En estos usos, los anticuerpos pueden ser marcados con moléculas fluorescentes, moléculas marcadoras de spin, enzimas, o radioisótopos, y pueden ser provistos en forma de kit con todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo de detección. Los anticuerpos pueden también ser utilizados para purificar formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR, o compañeros de unión de formas monoméricas, mal plegadas, agregadas o fibrilares de TTR, por ej. mediante cromatografía de afinidad.

[0344] Los anticuerpos también pueden ser utilizados para inhibir o reducir la agregación de TTR, inhibir o reducir la formación fibrilar de TTR, reducir o eliminar depósitos de TTR o de agregados de TTR, o estabilizar conformaciones no tóxicas de TTR en una muestra biológica. La muestra biológica puede comprender, por ejemplo, sangre, suero, plasma, o tejido (por ej. tejido del corazón, sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo, riñones, ojos, grasa abdominal, o tracto gastrointestinal). En algunas instancias, la agregación de TTR, la formación fibrilar de TTR o depósitos de TTR son inhibidos o reducidos en al menos 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, o 75%, (por ej. 10%-75% o 30%-70%). Los ensayos para detectar formación fibrilar están descriptos en otra parte en la presente. Ver también US 2014/0056904.

[0345] Todas las presentaciones de patentes, sitios web, otras publicaciones, números de acceso y lo similar citados más arriba o más abajo están incorporados como referencia en su totalidad para todos los propósitos en el mismo grado en que si cada ítem individual estuviera específicamente e individualmente indicado para ser así incorporado como referencia. Si diferentes versiones de una secuencia están asociadas con un número de acceso en diferentes tiempos, se quiere indicar la versión asociada con el número de acceso a la fecha efectiva de presentación de esta solicitud. La fecha de presentación efectiva significa la fecha más temprana de la fecha de presentación real o fecha de presentación de una solicitud prioritaria que se refiere al número de acceso si es aplicable. De manera similar, si diferentes versiones de una publicación, sitio web o lo similar están publicadas en diferentes tiempos, se indica la versión más recientemente publicada a la fecha de presentación efectiva de la solicitud a menos que se indique de otra manera. Cualquier característica, etapa, elemento, forma de realización, o aspecto de la invención puede ser utilizado en combinación con cualquier otra a menos que se específicamente se indique de otra manera. A pesar de que la presente invención ha sido

descripta en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad y comprensión, será evidente que ciertos cambios y modificaciones pueden ser llevados a la práctica dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del inmunógeno e Inmunización de ratones para 18C5

[0346] Se inyectaron tanto ratones hembra BALB/c como C57BL/6 con transtiretina modificada por ingeniería con una mutación en F87M y L110M referida como transtiretina-doble mutante (TTR-DM). Se inyectaron semanalmente una inyección intraperitoneal de 50 µg/ratón por tres inyecciones seguido por 25 µg/ratón por 3 inyecciones y seguido por 10 µg/ratón por 4 inyecciones de TTR-DM emulsionada en adyuvante RIBI, utilizando 5 BALB/c, adicionalmente se inyectaron 5 ratones C57BL/6 por 3 inyecciones a 50 µg/ratón, 3 inyecciones a 25 µg/ratón y 4 inyecciones a 10 µg/ratón emulsionadas en adyuvante RIBI. Los ratones fueron titulados contra las TTR-DM, TTR tetramérica nativa y his-MCAM. Los ratones con los más altos títulos para TTR-DM y los más bajos títulos para TTR tetramérica nativa y his-MCAM (BALB/c N° 1 y 5 y C57BL/6 N° 4 y 5) fueron fusionados mediante una modificación de Kohler y Milstein. Los hibridomas resultantes fueron relevados contra TTR-DM, TTR tetramérica nativa y his-MCAM. Los hibridomas que mostraban especificidad para TTR-DM fueron clonados y caracterizados adicionalmente. Se identificó 18C5.

Ejemplo 2. Caracterización de 18C5 mediante BIAcore

[0347] Se llevó a cabo el análisis utilizando Biacore T200 para comparar la afinidad de unión de anticuerpos murinos a TTR humana recombinante desnaturalizada en Clorhidrato de Guanidina 6M (Gu-hTTR), TTR de Cinomolgo desnaturalizada en Clorhidrato de Guanidina 6M (Gu-cTTR), y TTR humana tetramérica nativa. Se inmovilizó anticuerpo anti-ratón sobre un chip sensor CM3 (GE Healthcare Life Sciences) mediante acoplamiento de aminas y se capturaron anticuerpos murinos (ligando) a un nivel para asegurar una máxima unión del analito de 50 UR (aproximadamente 250 UR de unión a ligando). Se pasaron varias concentraciones de Gu-TTR (en el rango de desde 0,4 nM a 100 nM) sobre el ligando capturado a 50 µL/min en buffer de corrida (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL, Gu-HCl 50mM) durante un tiempo de asociación de 300 s y un tiempo de disociación de 900 s. La regeneración de la superficie del chip fue lograda mediante 2 inyecciones breves de Glicina-HCl 10 mM a pH 1,7. Las concentraciones de Gu-cTTR utilizadas estaban en el rango de 1-1000 nM, mientras que

las concentraciones del tetrámero de TTR humana estaban en el rango de desde 10 nM a 10.000 nM. Se sustrajo el blanco de los datos tanto para un sensor que no contenía ligando como con concentración de analito 0 nM. El análisis fue llevado a cabo utilizando un ajuste 1:1 global con el software Biacore Evaluation (v3.0) configurando el índice de refracción global a cero UR. Los datos de unión se muestran en la Tabla 4.

[0348] Tabla 4. Datos de unión de 18C5 hacia TTR mal plegada humana y TTR mal plegada de Cinomolgo, y tetrámero de TTR humana

TTR	ka 1/Ms	kd 1/s	K_D nM
TTR mal plegada Humana	1,1X10 ⁵	6,2X10 ⁻⁴	5,9 nM
TTR mal plegada de Cinomolgo	1,0X10 ⁵	9,2X10 ⁻⁴	Mínima unión a la más alta concentración, difícil estimar la KD
Tetrámero de TTR Humana	2,2X10 ³	2,2X10 ⁻⁴	Mínima unión a la más alta concentración, difícil estimar la KD

Ejemplo 3: Caracterización de 18C5 quimérico mediante BIAcore

[0349] Se llevó a cabo un análisis utilizando Biacore T200 para comparar la afinidad de unión de anticuerpos murino y quimérico para TTR humana recombinante desnaturalizada en Clorhidrato de Guanidina 6M (Gu-hTTR). Se inmovilizó anticuerpo anti-humano en las celdas de flujo 1 y 2, se inmovilizó anticuerpo anti-ratón en las celdas de flujo 3 y 4 sobre un chip sensor CM3 (GE Healthcare Life Sciences) mediante acoplamiento de aminas, se capturaron anticuerpos (ligando) 18C5 quimérico y murino a un nivel para asegurar una máxima unión de analito de 50 UR (aproximadamente 250 UR de unión a ligando). Se pasaron varias concentraciones de Gu-TTR (en el rango de desde 0,4 nM a 100 nM) sobre el ligando capturado a 50 µL/min en buffer de corrida (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL, Gu-HCl 50 mM) durante un tiempo de asociación de 300 s y un tiempo de disociación de 900 s. La regeneración de la superficie del chip fue lograda mediante 2 breves inyecciones de Cloruro de Magnesio 3 M o 2 breves inyecciones de Glicina-HCl 10 mM a pH 1,7. Se sustrajo el blanco de los datos tanto

para un sensor que no contenía ligando como con concentración de analito 0 nM. El análisis fue llevado a cabo utilizando un ajuste 1:1 global con el software Biacore Evaluation (v3.0) configurando el índice de refracción global a cero UR. Los datos de unión se muestran en la Tabla 5.

[0350] Se provee una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada madura de un anticuerpo 18C5 quimérico como SEQ ID NO:81, se provee una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana madura de un anticuerpo 18C5 quimérico como SEQ ID NO:87, una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada humana de SEQ ID NO:17, y una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena liviana humana de SEQ ID NO:19.

[0351] Tabla 5. Datos de unión de anticuerpos murino y quimérico a TTR humana recombinante desnaturalizada en Clorhidrato de Guanidina 6M (Gu-hTTR).

TTR	ka 1/Ms	kd 1/s	K_D nM
18C5 Quimérico	1,3X10 ⁵	1,6X10 ⁻⁴	1,8 nM
18C5 Murino	9,9X10 ⁴	2,1X10 ⁻⁴	2,2 nM

Ejemplo 4. Mapeo del Epítotope de 18C5

[0352] El mapeo inicial mostró que el epítotope para 18C5 cae dentro de 87-127 de la SEQ ID NO:26. El mapeo adicional mostró que el epítotope cae entre 101-109 de la SEQ ID NO:26. La afinidad mucho menor por TTR de Cinomolgo mal plegada sugiere que al aminoácido 104 es importante ya que ésta es la única sustitución de aminoácido entre TTR humana y de Cinomolgo.

Ejemplo 5. Secuencia de 18C5

[0353] Se utilizó un pellet de células congeladas clon LA89 18C5. A1.A1 hibridoma de 18C5 para extracción y purificación de ARNm. El aislamiento y purificación de ARNm fueron llevados a cabo utilizando el protocolo mini kit ARNm directo Oligotex (Qiagen, cat. N° 72022). Brevemente, 9×10^6 células clonales de hibridoma fueron lisadas y homogeneizadas en presencia de buffer de guanidina-isotiocianato altamente desnaturizante, el cual inactiva las ARNasas. Se agregó la suspensión Oligotex a la mezcla de lisis, se permitió que tuviera lugar hibridización entre oligo dT30 de las partículas de Oligotex y la cola poly-A del ARNm. Las contaminaciones fueron luego lavadas y se eluyó poli-A + ARN. El ARNm fue transcrito inversamente a ADNc utilizando el kit de amplificación de ADNc de Marathon (Clontech, cat. N°634913). Un adaptador fue ligado al extremo 5' del ADNc. Se utilizó el método 5'RACE para amplificar las regiones V. Se utilizaron cebadores consenso de región 5' V y cebadores ancla específicos de la región constante para PCR. Las regiones V amplificadas fueron clonadas en el vector de clonación pTOPO y transformadas en *E. coli* Top 10. Se hicieron crecer 15-20 colonias individuales y el plásmido purificado fue secuenciado. Una secuencia clonal fue considerada una región V genuina si cumplía los siguientes criterios

Sin codón stop entre Met y la región C

La secuencia contiene características clave de las regiones V del anticuerpo

La secuencia contiene CDRs definibles.

Mínimo tres clones independientes con ORF correspondientes

[0354] Las secuencias de las regiones variables determinadas fueron clonadas en vectores de expresión y transfectadas en células CHO. El anticuerpo quimérico purificado fue caracterizado en cuanto a unión utilizando 18C5 murino como anticuerpo de control.

[0355] La secuencia de aminoácidos de la región variable madura de la cadena pesada de 18C5 está provista en la SEQ ID NO:81 y la secuencia de aminoácidos variable madura de la cadena liviana de 18C5 está provista en la SEQ ID NO:87. Las secuencias de aminoácidos de las CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada Kabat/Chothia Composite están provistas en las SEQ ID NOs: 5, 7 y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena liviana Kabat/Chothia Composite están provistas en las SEQ ID NOs: 11, 13 y 15 respectivamente.

Ejemplo 6. Especificidad de 18C5 Demostrada mediante Análisis Western blot

[0356] Para demostrar la especificidad conformacional de 18C5 hacia TTR no nativa (desnaturalizada), se llevó a cabo un análisis Western blot como sigue:

Procedimiento:

[0357] Geles SDS-poliacrilamida

[0358] TTR Nativa: Una muestra de 1,0, 0,5 y 0,1 µg de TTR humana recombinante en buffer de muestra LDS (Life Technologies) fue corrida en un bis-tris gel NuPAGE 10% (buffer MES; 90 V, 105 min) y transferida a membranas de nitrocelulosa para análisis Western blot.

[0359] TTR Desnaturalizada: Se preparó TTR humana recombinante como se describe arriba para TTR nativa excepto que el buffer de muestra LDS contenía agente reductor y las muestras fueron desnaturalizadas mediante ebullición antes de SDS-PAGE.

[0360] Análisis Western blots

[0361] Geles SDS-PAGE fueron transferidos sobre membranas de nitrocelulosa (iBlot, Life Technologies), tratados con buffer bloqueante (LI-COR, Lincoln, NE) e incubados en 1,0-µg/mL de anticuerpo primario, lavados con TBS 1x y colocados en dilución 1:20.000 de anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado con IRDye 800CW (LI-COR, Lincoln, NE), luego revelado en un sistema de imágenes infrarrojo Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE).

[0362] Resultados y Conclusiones:

[0363] El ensayo Western Blot de TTR nativa vs. recombinante (Figura 1) mostró que 18C5 tenía una muy débil reactividad hacia especies de TTR nativas (Calles 1-3), pero muy fuerte

reactividad hacia monómero de TTR desnaturalizado (~15 kDa) con una pequeña reactividad hacia el dímero desnaturalizado (~30 kDa) (Calles 5-7). La Calle 4 muestra marcadores de peso molecular.

[0364] En contraste, un anticuerpo para TTR comercial (Sigma, N° de catálogo HPA002550) que no es conformacionalmente específico no distinguió entre TTR nativa versus desnaturalizada y mostró muy fuerte reactividad hacia TTR monomérica, así como también TTR nativa dimérica y TTR desnaturalizada (Figura 2). Las Calles 1-3 muestran resultados para TTR Nativa; la Calle 4 muestra marcadores de peso molecular y las Calles 5-7 muestran resultados para TTR Desnaturalizada.

Ejemplo 7. Diseño de anticuerpos 18C5 humanizados

[0365] El punto de partida o anticuerpo donante para la humanización fue un anticuerpo de ratón 18C5. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de m18C5 maduro es provista como SEQ ID NO: 81. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana de m18C5 maduro es provista como SEQ ID NO:87. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1, CDR2 y CDR3 del Kabat/Chothia Composite de la cadena pesada se proveen como las SEQ ID NOs:5, 7, y 9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3 de Kabat de la cadena liviana se proveen como las SEQ ID NOs:11, 13, y 15 respectivamente. Se utiliza la numeración Kabat.

[0366] El alineamiento de las secuencias de la región variable de 18C5 con las secuencias consenso de las regiones variables de anticuerpo a partir de Kabat, *et al.* indica que la región variable de cadena pesada (VH) de 18C5 pertenece al subgrupo 3b de VH de ratón, el cual corresponde al subgrupo 3 de VH humano. La región variable de cadena liviana kappa (VL) de 18C5 pertenece al subgrupo 2 de Vk de ratón, el cual corresponde al subgrupo 2 de Vk humano. [Kabat E.A., et al, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición. Publicación NIH No. 91-3242.].

[0367] Los residuos en la interfaz entre los dominios Vk y Vh son aquellos normalmente encontrados, excepto que Ala está en la posición 37 en la cadena pesada, mientras que típicamente Val o Ile está en esta posición. Leu en la posición 95 en Vh es típicamente Asp, Gly o Ser. Estas posiciones son candidatos para retromutaciones. Para la cadena Vk Glu 34 es típicamente Ala, His, Asn o Ser, y estas posiciones son candidatos para retromutaciones.

[0368] Las CDRs de VH y VL de 18C5 fueron identificadas utilizando reglas de identificación de CDR en base a secuencias de Martin. Las CDRs fueron asignadas a las clases canónicas de Chothia utilizando el resumen de residuos clave presentados en la Tabla 3.5 de Martin (Martin ACR. (2010). En: Kontermann R y Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Alemania: Springer International Publishing AG.):

CDR-H1 consiste en 10 aminoácidos y similar a la clase 1 canónica de Chothia.
CDR-H2 consiste en 17 aminoácidos y similar a la clase 3 canónica de Chothia.
CDR-H3 consiste en 4 aminoácidos; no hay clases para CDR-H3.

CDR-L1 consiste en 16 aminoácidos y similar a la clase canónica 4 de Chothia .
CDR-L2 consiste en 7 aminoácidos es de la clase 1 canónica de Chothia.
CDR-L3 consiste en 9 aminoácidos y es similar a la clase 1 canónica de Chothia.

[0369] Se realizó una búsqueda en relación a las secuencias de proteínas en la base de datos PDB [Deshpande et al, 2005, Nucleic Acids Research 33:D233-D237] para encontrar estructuras, lo que proveería un modelo estructural aproximado de 18C5. La estructura cristalina del Fab c#17 del anticuerpo anti-piroglutamato-Abeta murino (código PDB: 5MYK) [Piechotta, A. *et al.* ((2017) J. Biol. Chem. 292: 12713–12724) fue utilizado para la estructura de tanto Vh como Vk ya que tiene buena resolución (1,6 Å) y una similaridad de secuencia general a Vh y Vk de 18C5 reteniendo las mismas estructuras canónicas para los bucles. Fue utilizado el programa Bioluminate para modelar una estructura general de 18C5. Este programa es licenciado a Schrodinger Inc.

[0370] Las regiones marco de VH y VL de 18C5 comparten un alto grado de similaridad de secuencias con las regiones correspondientes de Crenezumab Fab humanizado (CreneFab) PDB: 5VZY, diseñadas por Ultsch M, et al. ((2016) Sci Rep.6:39374) Los dominios variables de 18C5 y CreneFab comparten también idénticas longitudes para los bucles de CDR-H1, H2, L1, L2, y L3. Las regiones marco de VH (5VZY-VH) y VL (5VZY-VL) de CreneFab fueron elegidas como las secuenciasceptoras para las CDRs de 18C5. El programa Bioluminate fue utilizado para modelar la estructura. Este programa es licenciado a Schrodinger Inc.

[0371] Las secuencias variantes de cadena pesada y liviana que resultan del proceso de humanización del anticuerpo fueron además alineadas a las secuencias de línea germinal humana utilizando la herramienta IMGT Domain GapAlign para evaluar la humanización de las cadenas pesada y liviana como es indicado por las pautas de guía del comité WHO INN

“WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>). Los residuos fueron cambiados para alinearlos con la secuencia correspondiente de la línea germinal humana, donde fue posible, para mejorar la humanización. Para la variante VL_v2 humanizada, se introdujo una mutación Q45R para obtener la secuencia más similar al gen de línea germinal humana IGKV2-30*02 (GenBank acc. No. CAA77315; SEQ ID NO:90). Las secuencias de aminoácidos que consisten en los marcos de CreneFab y las CDRs de 18C5 se designaron hu18C5-VH_v1 y hu18C5-VL_v1.

[0372] Se diseñaron otras versiones de hu18C5-VH y hu18C5-VL para posibilitar la evaluación de diversos residuos de estructuras en cuanto a sus contribuciones a la unión a antígeno e inmunogenicidad. Las posiciones consideradas para mutación incluyen aquellas que::

- definen las conformaciones de CDR canónica (resumido en Martin 2010),
- están dentro de la zona de Vernier (Foote J y Winter G. (1992). *J Mol Biol.* 224(2):487-99),
- localizan a la interfaz de dominio VH/VL (resumido en Léger OJP y Saldanha J. (2000) *Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting*. En: Shepherd P y Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),
- son susceptibles de modificaciones pos-traduccionales, tales como glicosilación o piroglutaminación,
- están ocupadas por residuos que se predice que son incompatibles con las CDRs, de acuerdo al modelo de CDRs de 18C5 injertadas sobre regiones de marco de Crenezumab Fab, o
- están ocupadas por residuos que son raros entre los anticuerpos humanos secuenciados, donde o bien el residuo 18C5 parental de ratón o algún otro residuo es mucho más frecuente.

[0373] Se construyeron 2 variantes de región variable de cadena pesada humanizada y 2 variantes de región variable de cadena liviana humanizada, que contienen diferentes permutaciones de sustituciones: hu18C5-VH_v1 y hu18C5-VH_v2, (SEQ ID NOs: 85-86, respectivamente) y hu18C5-VL_v1 y hu18C5-VL_v2_v6 (SEQ ID NOs: 91-92, respectivamente). (Tablas 6 y 7). Los diseños de ejemplo Vk y Vh humanizadas, con retromutaciones y otras mutaciones basadas en regiones de marco humanas seleccionadas, se muestran en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Las áreas en negrita en las Tablas 6 y 7 indican las CDRs como definido por Kabat/Chothia Composite. Un “-” indica que no hay aminoácido en la posición indicada. Las SEQ ID NOs: 86 y 92 contienen retromutaciones y otras mutaciones como se muestran en la Tabla 8. Los aminoácidos en las posiciones en hu18C5-VH_v1 y hu18C5-VH_v2 están listadas en la Tabla 9. Los aminoácidos en las posiciones en hu18C5-VL_v1 y hu18C5-VL_v2 están listadas en la Tabla 10. Los porcentajes de humanización para las cadenas VH humanizadas hu18C5-VH_v1 y hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NOs: 85-86, respectivamente) con respecto al gen más similar de la línea germinal humana IGHV3-48*01, y para las cadenas VL humanizadas hu18C5-VL_v1 y hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NOs: 91-92, respectivamente) con respecto al gen más similar de la línea germinal humana IGKV2-30*02, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 7: Regiones VL de 18C5 Humanizado

<u>Residuo lineal N^a</u>	<u>Residuo Kabat N^a</u>	FR o CDR	<u>VL de 18C5 murino (SEQ ID NO:87)</u>	<u>Aceptor 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO: 89)</u>	<u>hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)</u>	<u>hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)</u>
1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V
3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L
10	10	Fr1	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	I	L	I	I

30	27C	CDR-L1	V	V	V	V
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1		–	–	–
34	28	CDR-L1	N	N	N	N
35	29	CDR-L1	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	N	D	N	N
37	31	CDR-L1	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	E	H	E	E
41	35	Fr2	W	W	W	W
42	36	Fr2	Y	Y	Y	Y
43	37	Fr2	L	L	L	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	K	K	K	K
46	40	Fr2	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	Q	Q	R
52	46	Fr2	L	L	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	K	K	K	K
57	51	CDR-L2	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	N	N	N	N
60	54	CDR-L2	R	R	R	R
61	55	CDR-L2	F	F	F	F
62	56	CDR-L2	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F
69	63	Fr3	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S

72	66	Fr3	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G
91	85	Fr3	I	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	F	S	F	F
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	S	G	G
98	92	CDR-L3	S	T	S	S
99	93	CDR-L3	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	V	V	V	V
101	95	CDR-L3	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	–	–	–	–
103	95B	CDR-L3	–	–	–	–
104	95C	CDR-L3	–	–	–	–
105	95D	CDR-L3	–	–	–	–
106	95E	CDR-L3	–	–	–	–
107	95F	CDR-L3	–	–	–	–
108	96	CDR-L3	L	W	L	L
109	97	CDR-L3	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G
112	100	Fr4	A	Q	Q	Q
113	101	Fr4	G	G	G	G

114	102	Fr4	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E
118	106	Fr4	L	I	I	I
119	106A	Fr4	–	–	–	–
120	107	Fr4	K	K	K	K

Tabla 7: Regiones VH de 18C5 Humanizado

Residuo lineal N ^a	Residuo Kabat N ^a	FR o CDR	VH de 18C5 Murino (SEQ ID NO:81)	Aceptor 5VZY-VH huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO:83)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
1	1	Fr1	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	K	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	L	V	V	V
6	6	Fr1	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	G	G	G	G
10	10	Fr1	G	G	G	G
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	V	V	V	V
13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	S	S	S	S
18	18	Fr1	L	L	L	L
19	19	Fr1	N	R	R	R
20	20	Fr1	L	L	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C
23	23	Fr1	V	A	A	A
24	24	Fr1	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	D	T	D	D
29	29	CDR-H1	F	F	F	F

30	30	CDR-H1	S	S	S	S
31	31	CDR-H1	R	S	R	R
32	32	CDR-H1	F	Y	F	F
33	33	CDR-H1	W	G	W	W
34	34	CDR-H1	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	S	S	S	S
36	35A	CDR-H1	–	–	–	–
37	35B	CDR-H1	–	–	–	–
38	36	Fr2	W	W	W	W
39	37	Fr2	A	V	V	A
40	38	Fr2	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P
44	42	Fr2	G	G	G	G
45	43	Fr2	R	K	K	K
46	44	Fr2	G	G	G	G
47	45	Fr2	Q	L	L	Q
48	46	Fr2	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	L	L	W
50	48	Fr2	I	V	V	I
51	49	Fr2	G	A	A	G
52	50	CDR-H2	E	S	E	E
53	51	CDR-H2	I	I	I	I
54	52	CDR-H2	N	N	N	N
55	52A	CDR-H2	P	S	P	P
56	52B	CDR-H2	–	–	–	–
57	52C	CDR-H2	–	–	–	–
58	53	CDR-H2	G	N	G	G
59	54	CDR-H2	S	G	S	S
60	55	CDR-H2	S	G	S	S
61	56	CDR-H2	T	S	T	T
62	57	CDR-H2	I	T	I	I
63	58	CDR-H2	N	Y	N	N
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	T	P	T	T
66	61	CDR-H2	P	D	P	P
67	62	CDR-H2	S	S	S	S
68	63	CDR-H2	L	V	L	L
69	64	CDR-H2	K	K	K	K
70	65	CDR-H2	D	G	D	D
71	66	Fr3	K	R	R	R

72	67	Fr3	F	F	F	F
73	68	Fr3	I	T	T	T
74	69	Fr3	I	I	I	I
75	70	Fr3	S	S	S	S
76	71	Fr3	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	N	N	N	N
79	74	Fr3	A	A	A	A
80	75	Fr3	K	K	K	K
81	76	Fr3	N	N	N	N
82	77	Fr3	T	S	S	S
83	78	Fr3	L	L	L	L
84	79	Fr3	F	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	L	L	L
86	81	Fr3	Q	Q	Q	Q
87	82	Fr3	M	M	M	M
88	82A	Fr3	S	N	N	N
89	82B	Fr3	K	S	S	S
90	82C	Fr3	V	L	L	L
91	83	Fr3	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	A	A	A
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	S	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	L	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C
101	93	Fr3	A	A	A	A
102	94	Fr3	R	S	S	R
103	95	CDR-H3	L	G	L	L
104	96	CDR-H3	G	–	G	G
105	97	CDR-H3	Y	–	Y	Y
106	98	CDR-H3	G	–	G	G
107	99	CDR-H3	N	–	N	N
108	100	CDR-H3	Y	–	Y	Y
109	100A	CDR-H3	G	–	G	G
110	100B	CDR-H3	W	–	W	W
111	100C	CDR-H3	A	–	A	A
112	100D	CDR-H3	L	–	L	L
113	100E	CDR-H3	–	–	–	–

114	100F	CDR-H3	–	–	–	–
115	100G	CDR-H3	–	–	–	–
116	100H	CDR-H3	–	–	–	–
117	100I	CDR-H3	–	–	–	–
118	100J	CDR-H3	–	–	–	–
119	100K	CDR-H3	–	–	–	–
120	101	CDR-H3	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Tabla 8

Retromutaciones y otras mutaciones de V_H, V_L para 18C5 humanizado

Variante de V_H o V_L	Secuencia aceptora de exones V_H o V_L	Cambios de los Residuos de la Región de Marco Aceptora (basado en CDRs de Kabat/Chothia Composite)
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	Aceptor 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO:83)	Ninguno
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	Aceptor 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO:83)	H37, H45, H47, H48, H49, H94
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	Aceptor 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO: 89)	Ninguno
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	Aceptor 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO: 89)	L2, L45

Tabla 9

Numeración de Kabat de los Residuos de la Región de Marco (en base a CDRs de Kabat/Chothia Composite) para Retromutaciones y Otras Mutaciones en las Cadenas Pesadas de Anticuerpos 18C5 Humanizados

Residuo Kabat N ^a	Aceptor 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO:83)	VH de 18C5 Murino (SEQ ID NO: 81)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
H37	V	A	V	A
H45	L	Q	L	Q
H47	L	W	L	W
H48	V	I	V	I
H49	A	G	A	G
H94	S	R	S	R

Tabla 10

Numeración de Kabat de los Residuos de Región Marco (en base a CDRs de Kabat/Chothia Composite) para Retromutaciones y Otras Mutaciones en las Cadenas Livianas de Anticuerpos 18C5 Humanizados

Residuo Kabat N ^a	Aceptor 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. N° 5VZY (SEQ ID NO: 89)	VL de 18C5 Murino (SEQ ID NO:87)	hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)
L2	I	V	I	V
L45	Q	K	Q	R

Tabla 11

Porcentaje de Humanización de las Cadenas Pesada y Liviana de Anticuerpos 18C5 Humanizados

Variante de V_H o V_L	% de Humanización
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	96,2%
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	93,8%
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	88,6%
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	92,4%

[0374] Las posiciones a las cuales difieren los residuos canónicos de clase Chothia, Vernier, o de interfaz/empaquetado entre secuencias aceptoras de ratón y humanas, son candidatas para sustitución. Ejemplos de residuos canónicos de clase Chothia incluyen los residuos Kabat H48 en las Tablas 6 y 7. Ejemplos de residuos (VH+VL) de interfaz/empaquetamiento incluyen los residuos Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, y L98 en las Tablas 6 y 7.

[0375] El razonamiento para la selección de las posiciones indicadas en la Tabla 6 en la región variable de cadena liviana como candidatos para sustitución son como sigue.

I2V es una retromutación de un residuo canónico Chothia.

Q45R es una mutación al residuo de la línea germinal IGKV2-30*02. Q es raro en ser humano en esta posición. R es frecuente en esta posición.

[0376] *hu18C5-VL_v1*: bucles de CDR-L1, L2, y L3 de 18C5-VL injertados sobre la región de marco de CreneFab (5VZY-VL).

[0377] *hu18C5-VL_v2*: revierte todas las sustituciones de la región de marco en las posiciones que son clave para definir las clases canónicas Chothia, son parte de la zona Vernier, o localizan a la interfaz del dominio VH/VL; *hu18C5-VL_v2* incorpora retromutaciones I2V un aceptor a la mutación Q45R de línea germinal humana, para permitir la evaluación de las contribuciones de estas posiciones a la afinidad de la unión a antígeno e inmunogenicidad.

[0378] Regiones variables de cadena liviana:

[0379] hu18C5-VL_1 (SEQ ID NO: 91)

DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0380] hu18C5-VL_2 (SEQ ID NO: 92)

DVVMQTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

[0381] El razonamiento para la selección de las posiciones indicadas en la Tabla 7 en la región variable de cadena pesada como candidatos para la sustitución son como sigue.

V37A: es una retromutación en la zona Vernier. Val muestra interacción repulsiva con Trp47.

L45Q: es una retromutación de un residuo de interfaz central de acuerdo a Chothia. Leu en esta posición tiene repulsión a las interacciones de Van der Waals.

L47W: es una retromutación de un residuo de interfaz. En 18C5 murino Trp está en posición 47 y Trp hace una unión de hidrógeno con Ser 35 estabilizando de este modo las láminas beta entre cadenas. Leu no estabiliza ninguna interfaz con ningún residuo y puede desestabilizar la conformación.

V48I: es una retromutación de una CDR que interactúa con un residuo de la zona Vernier para preservar esta interacción.

A49G: es una retromutación de un residuo de la zona Vernier.

S94R: es una retromutación de un residuo de la zona Vernier, para preservar la interacción de CDR.

[0382] hu18C5-VH_v1: bucles CDR-H1, H2, y H3 de 18C5-VH injertado sobre la región de marco de VH de CreneFab (5VZY-VH).

[0383] Hu18C5-VH_v2: revierte todas las sustituciones de región de marco en las posiciones que son clave para definir las clases canónicas de Chothia, son parte de la zona Vernier, o localizan a la interfaz de dominio VH/VL. 18C5-VH_v2 incorpora retromutaciones V37A,

L45Q, L47W, V48I, A49G y S94R, para hacer posible la evaluación de las contribuciones de estas posiciones a la afinidad de unión a antígeno e inmunogenicidad.

[0384] Regiones variables de la cadena pesada:

[0385] hu18C5-VH_1 (SEQ ID NO: 85)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWVRQAPGKGLELVAEINPGSS
TINYTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYW
GQGTTVTVSS

[0386] hu18C5-VH_2 (SEQ ID NO: 86)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPGSS
TINYTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYW
GQGTTVTVSS

Listado de Secuencias:

SEQ ID NO:1

secuencia de aminoácidos de la VH de 18C5 con péptido señal

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWAR
QAPGRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFIISRDNANKNTLFLQMSKVRSEDSALYYC
ARLGYGNYGWALDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:2

secuencia de nucleótidos que codifica la VH de 18C5 de ratón con péptido señal

ATGGATTTTGGGCTGATTTTTCATTGTTGCCCTTTTAAAAGGGGTCCAGTGTGA
GGTAAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAT
CTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGTTGGGCTCG
GCAGGCTCCAGGGAGAGGACAGGAATGGATTGGAGAGATTAATCCAGGAAGCA
GTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAA
CGCCAAAATACGCTGTTCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACTCAGC
CCTTTATTACTGTGCAAGACTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTAC
TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:3

secuencia de aminoácidos de la VL de 18C5 con péptido señal

MKLPVRLLVLMFWIPASRSDVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLE
WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGS
HVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:4

secuencia de nucleótidos que codifica a VL de 18C5 de ratón con péptido señal

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGAA
GTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACC
TATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA
AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGG
GACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTA

TTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTGGTGCTGGGACCAAGTTG
GAGCTGAAA

SEQ ID NO: 5

secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 de 18C5

GFDFSRLFWS

SEQ ID NO: 6

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H1 de 18C5

GGATTGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGT

SEQ ID NO: 7

secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 de 18C5

EINPGSSTINYTPSLKD

SEQ ID NO: 8

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H2 de 18C5

GAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGAT

SEQ ID NO: 9

secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 de 18C5

LGYGNYGWALDY

SEQ ID NO: 10

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-H3 de 18C5

CTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTAC

SEQ ID NO: 11

secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 de 18C5

RSSQSIVDSNGNTYLE

SEQ ID NO: 12

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L1 de 18C5

AGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTAGAA

SEQ ID NO: 13

secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 de 18C5

KVSNRFS

SEQ ID NO: 14

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L2 de 18C5

AAAGTTTCCAACCGATTTTCT

SEQ ID NO: 15

secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 de 18C5

FQGS HVPLT

SEQ ID NO: 16

secuencia de ácido nucleico que codifica una CDR-L3 de 18C5

TTTCAAGGTTTACATGTTCCGCTCACG

SEQ ID NO: 17

secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de 18C5 quimérico (IgG1 humana)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 18

secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de la cadena pesada de 18C5 quimérico (IgG1 humana)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACTTCCCCG

CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG
CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 19

secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena liviana de 18C5
quimérico (kappa humana)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una región
constante de la cadena liviana de 18C5 quimérica (kappa humana)

CGGGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT
TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA
GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA
G

SEQ ID NO:21

secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 a modo de ejemplo

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:22

secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:23

secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:24

secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena liviana con Arginina N-terminal a modo de ejemplo

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:25

secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena liviana sin Arginina N-terminal a modo de ejemplo

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:26

secuencia de aminoácidos de transtiretina humana descrita en número de acceso P02766.1 (UniProt)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKA
ADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEEV
FTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:27

secuencia de aminoácidos de transtiretina humana descrita en número de acceso AAB35639.1 (GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELH
GLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEEVFTANDSGPRRYTIAALLSPY
SYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:28

secuencia de aminoácidos de transtiretina humana descrita en número de acceso AAB35640.1 (GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGELH
GLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEEVFTANDSGPRRYTIAALLSPY
SYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:29

secuencia de aminoácidos de transtiretina humana descrita en número de acceso ABI63351.1 (GenBank)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKA
ADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEEV
FTANDSGPRRYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:30

secuencia de aminoácidos de los residuos 101-109 de transtiretina humana

GPRRYTIAA

SEQ ID NO:31

secuencia de aminoácidos de los residuos 87-127 de transtiretina humana

FHEHAEEVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:32

secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de la cadena pesada de IgG1 G1m3 a modo de ejemplo

GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATG
CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO:33

secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena liviana con Arginina N-terminal a modo de ejemplo

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC
CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:34

secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena liviana sin Arginina N-terminal a modo de ejemplo

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTG
ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO:35

secuencia de aminoácidos de un péptido señal de región constante de cadena pesada

MNFGLSLIFLVVLKGVQC

SEQ ID NO:36

secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de región constante de cadena pesada

ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTGTTTAAAAGGTGTCCAGTG
T

SEQ ID NO:37

secuencia de aminoácidos de un péptido señal de región constante de cadena liviana

MESHTQVFVFLWLSGVDG

SEQ ID NO:38

secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de región constante de cadena liviana

ATGGAGTCACATACTCAGGTCTTTGTATTTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGGA
CGGA

SEQ ID NO: 39

secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 Kabat de 14G8

SYTMS

SEQ ID NO: 40

secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 Kabat de 14G8

EINNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 41

secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 Kabat de 14G8

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 42

secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 Kabat de 14G8

RSNKSLLSNGNTYLY

SEQ ID NO: 43

secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 Kabat de 14G8

RVSNLAS

SEQ ID NO: 44

secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 Kabat de 14G8

MQHLEYPLT

SEQ ID NO: 45

epítoto de 5A1

EHAEEVFTA

SEQ ID NO: 46

secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 Kabat de 5A1

NYAMS

SEQ ID NO: 47

secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 Kabat de 5A1

SISSGGSTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 48

secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 Kabat de 5A1

YYYGQYFDF

SEQ ID NO: 49

secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 Kabat de 5A1

KASQDVSTTVA

SEQ ID NO: 50

secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 Kabat de 5A1

SASYRCT

SEQ ID NO: 51

secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 Kabat de 5A1

QQHYSTPLT

SEQ ID NO: 52

secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 Kabat de 6C1

NYYMS

SEQ ID NO: 53

secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 Kabat de 6C1

YISIDGNNIYHPDSVKG

SEQ ID NO: 54

secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 Kabat de 6C1

DSDYGYFDV

SEQ ID NO: 55

secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 Kabat de 6C1

RSSQSIVHSNGNTYLE

SEQ ID NO: 56

secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 Kabat de 6C1

KVSKRFS

SEQ ID NO: 57

secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 Kabat de 6C1

FQGSHVPLT

SEQ ID NO: 58

secuencia de aminoácidos de la región VH de AD7F6

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWIRQTPDKRLEWVATISSSGTY
TYYTESVKGRFTVSRDNAKNTLSLQMSNLKSDDTAMYYCTRQAYGREYFDVWGTG
TTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVH
TFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDDKKLEPSGPISTINPCP
PCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCTVVDVSEDDPDVRISWV
NNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTI
SKIKGLVRAPQVYILPPPAAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDT
APVLDSGSGSYFIYSKLDIKTSTVGENRFLLMQRETRGSEKLLPEEDHLPSPGK

SEQ ID NO: 59

secuencia de aminoácidos de la región VL de AD7F6

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFDSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
ASNRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYFCKQSNYLRFTGGGTRVEIKRA
DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQ
DSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 60

secuencia de aminoácidos de CDR-H1 de RT24

RYWIT

SEQ ID NO: 61

secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de RT24

DIYPGSGRTNYNEKFKN

SEQ ID NO: 62

secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de RT24

YYGSTYFYV

SEQ ID NO: 63

secuencia de aminoácidos de CDR-L1 de RT24

RSSKSLLYKDGKTYLN

SEQ ID NO: 64

secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de RT24

LMSTRAS

SEQ ID NO: 65

secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de RT24

QQLVEYPRT

SEQ ID NO: 66

secuencia de aminoácidos de CDR-H1 de NI-301.35G11

SYAMS

SEQ ID NO:67

secuencia de aminoácidos de CDR-H2 de NI-301.35G11

SISGSGDTTKYTDSVKG

SEQ ID NO: 68

secuencia de aminoácidos de CDR-H3 de NI-301.35G11

DGSGRIDPFAL

SEQ ID NO: 69

secuencia de aminoácidos de CDR-L1 de NI-301.35G11

RSSRSLVYSDGNIYLN

SEQ ID NO: 70

secuencia de aminoácidos de CDR-L2 de NI-301.35G11

KVSNRDSG

SEQ ID NO: 71

secuencia de aminoácidos de CDR-L3 de NI-301.35G11

MQGTHWPRT

SEQ ID NO: 72

epítoto de MFD101, MDF102, MFD103, MFD105,

ADDTWEPFASGKT

SEQ ID NO: 73

epítoto de MFD107, MFD108, MFD109, MFD111

TSESGELHGLTTE

SEQ ID NO: 74

epítoto de MFD114

ALLSPYSYSTTAV

SEQ ID NO: 75

secuencia de aminoácidos de una CDR-H1 Kabat del anticuerpo 9D5

SYTMS

SEQ ID NO: 76

secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 Kabat del anticuerpo 9D5

EISNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 77

secuencia de aminoácidos de una CDR-H3 Kabat del anticuerpo 9D5

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 78

secuencia de aminoácidos de una CDR-L1 Kabat del anticuerpo 9D5

RSSKSLHLSNGNTYLY

SEQ ID NO: 79

secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 Kabat del anticuerpo 9D5

RVSNLAS

SEQ ID NO: 80

secuencia de aminoácidos de una CDR-L3 Kabat del anticuerpo 9D5

MQHLEYPLT

SEQ ID NO:81

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo

18C5 de ratón

EVKLLESGGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAPGRGQEWIGEINPGSST
INYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGWALDYWGQ
GTSVTVSS

SEQ ID NO: 82

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo Abeta
anti-piroglutamato murino Fab c#17

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISNLA
YSIYYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYCARYDYDNILDYVMDY
WGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 83

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada Crenezumab Fab
(CreneFab) PDB: 5VZY humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVASINSNGGS
TYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 84

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de la secuencia de
línea germinal humana IGHV3-48*01

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSST
IYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 85

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo 18C5
humanizado hu18C5-VH_1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWVRQAPGKGLELVAEINPGSS
TINYTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWALDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 86

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VH_2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPGSS
TINYTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWALDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:87

secuencia de aminoácidos de una región variable madura de la cadena liviana del anticuerpo 18C5 de ratón

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 88

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana del anticuerpo Abeta anti-piroglutamato murino Fab c#17

DVVMQTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 89

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana de Crenezumab Fab (CreneFab) PDB: 5VZY humanizado

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDTYLNHWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 90

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana de la secuencia de la línea germinal humana IGKV2-30*2

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS
NRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 91

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana del anticuerpo 18C5 humanizado hu18C5-VL_1

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 92

secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana del anticuerpo 18C5
humanizado hu18C5-VL_2

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGGTKVEIK

SEQ ID NO: 93

secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Kabat del anticuerpo 18C5 de ratón
RFWMS

SEQ ID NO: 94

secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Chothia del anticuerpo 18C5 de ratón
GFDFSRF

SEQ ID NO: 95

secuencia de aminoácidos de CDR-H1 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
SRFWMS

SEQ ID NO: 96

secuencia de aminoácidos de CDR-H2 Chothia del anticuerpo 18C5 de ratón
NPGSST

SEQ ID NO: 97

secuencia de aminoácidos de CDR-H2 AbM del anticuerpo 18C5 de ratón
EINPGSSTIN

SEQ ID NO: 98

secuencia de aminoácidos de CDR-H2 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
WIGEINPGSSTIN

SEQ ID NO: 99

secuencia de aminoácidos de CDR-H3 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
ARLGYGNYGWALD

SEQ ID NO: 100

secuencia de aminoácidos de CDR-L1 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
NTYLEWY

SEQ ID NO: 101

secuencia de aminoácidos de CDR-L2 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
LLIYKVS NRF

SEQ ID NO: 102

secuencia de aminoácidos de CDR-L3 Contact del anticuerpo 18C5 de ratón
FQGSHVPL