

AGENTE TERAPÉUTICO PARA ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

CAMPO TÉCNICO

[0001]

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-gpNMB que tiene las funciones de disminuir el número de microglía mal funcional en un sujeto y/o eliminar oligómeros de amiloide β en un sujeto y/o aumentar el número de sinapsis en un sujeto y/o restaurar funciones cognitivas, y a un fármaco farmacéutico que comprende un ingrediente que tiene tales funciones.

TÉCNICA ANTECEDENTE

[0002]

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos neurológicos progresivos en los que la acumulación de proteínas tóxicas (proteínas que no se pueden degradar intracelularmente debido a la multimerización o formación de agregados provocada por cambios estructurales) en las células nerviosas da como resultado un deterioro de las funciones de neurotransmisión y eliminación intracelular de las células nerviosas, así como muerte celular, lo que conduce al deterioro cognitivo, deterioro de la memoria, deterioro mental y deterioro de la función motora. Las enfermedades neurodegenerativas no tienen terapias fundamentales, y se utilizan fármacos que alivian los síntomas asociados a las enfermedades. La mayoría de estas "enfermedades neurodegenerativas" son "enfermedades degenerativas del sistema nervioso central".

[0003]

Los ejemplos clasificados como enfermedades neurodegenerativas incluyen (1) taupatías (enfermedades en las que se acumula Tau y causa neurodegeneración): específicamente, la enfermedad de Alzheimer, la degeneración del lóbulo frontotemporal (FTLD-Tau), la demencia frontotemporal (FTD), la tauopatía primaria relacionada con la edad (PART), encefalopatía traumática crónica (CTE), enfermedad de Pick, degeneración de los ganglios basales de la corteza cerebral (CBD o CBS), parálisis supranuclear progresiva (PSP), tauopatía globular glial (GGT), demencia granular argirófila (AGD) (enfermedad granular argirófila), Tauopatía astrogliar tau (ARTAG), demencia británica familiar (FBD), demencia danesa familiar (FDD), FTDP17, tauopatía multisistémica con demencia (MSTD), demencia de ovillo neurofibrilar, ovillo neurofibrilar con calcinosis (DNTE) y tauopatía de sustancia blanca con inclusión glial globular (WMT-GGI); y (2) enfermedades neurodegenerativas distintas de las taupatías: específicamente, enfermedad de Parkinson (acumulación de α Syn), enfermedad de Huntington (acumulación de huntingtina mutante),

degeneración del cerebelo de la médula espinal (acumulación de proteína de ácido poliglutámico), ataxia cerebelosa hereditaria de la médula espinal (acumulación de poliglutámico proteína ácida), atrofia muscular espinobulbar (acumulación de proteína de ácido poliglutámico), demencia con cuerpos de Lewy (acumulación de α Syn), enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (acumulación anormal de proteína priónica), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (acumulación de SOD o TDP43), y degeneración lobular frontotemporal (acumulación de FTLTDP, FTLTDP:FUS:TDP43 o FUS).

[0004]

2. Enfermedad de Alzheimer (demencia tipo Alzheimer)

La demencia es reconocida como un problema importante en el envejecimiento de la población mundial. Según un estudio realizado por Alzheimer's Disease International, se prevé que la cantidad de pacientes con demencia en todo el mundo aumente a aproximadamente 76 millones para 2030 y luego a 139 millones para 2050.

[0005]

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se informa que entre el 60 y el 70% de todas las demencias son la enfermedad de Alzheimer (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>). Se han informado dos patologías principales en la enfermedad de Alzheimer: placas seniles (depósito de amiloide) y cambios neurofibrilares (acumulación de tau).

[0006]

Debido a que los pacientes con la enfermedad de Alzheimer familiar tienen mutaciones genéticas asociadas con una mayor producción de amiloide, se están realizando investigaciones sobre anticuerpos y vacunas contra el amiloide beta ($A\beta$), un componente del amiloide. Varios anticuerpos anti- $A\beta$ que eliminan el depósito de amiloide (Bibliografía No Patentada 1) y fármacos dirigidos a los oligómeros $A\beta$ (Bibliografía No Patentada 2), que se consideran altamente tóxicos, ya están en desarrollo clínico, y aducanumab (Bibliografía No Patentada 3) recibió la aprobación condicional de la FDA en 2021. Sin embargo, se informa que estos medicamentos contra el amiloide muestran solo eficacias limitadas y también implican un alto riesgo de efectos secundarios.

[0007]

El Tau, otro componente de los ovillos neurofibrilares, también está atrayendo la atención como un objetivo de descubrimiento de fármacos, ya que un análisis reciente de imágenes cerebrales ha confirmado una correlación entre la acumulación de Tau y los síntomas clínicos y la progresión de la enfermedad. Actualmente se están realizando ensayos clínicos de anticuerpos anti-Tau contra varios epítomos (Bibliografía No Patentada 4).

[0008]

Otras técnicas para transferir anticuerpos de manera eficiente al cerebro para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer incluyen anticuerpos contra las proteínas de membrana expresadas en la barrera hematoencefálica (BBB), como los receptores de transferrina, o anticuerpos que pueden pasar de manera eficiente a través de la BBB agregando péptidos con afinidad a la región constante o introduciendo mutaciones de aminoácidos (Bibliografía No Patentada 5).

[0009]

Sin embargo, actualmente no existen medicamentos efectivos para inhibir o mejorar la función cognitiva deteriorada, y la creación de medicamentos efectivos para la enfermedad de Alzheimer es un problema apremiante en todo el mundo.

[0010]

3. Microglía

La microglía pertenece a la familia de células gliales, que también incluye astrocitos y oligodendrocitos. Sin embargo, a diferencia de los astrocitos y los oligodendrocitos, la microglía se origina a partir de células progenitoras que se desarrollan en el saco vitelino embrionario. La microglía son células similares a los macrófagos en el cerebro y se cree que actúan como células inmunocompetentes en el sistema nervioso central, por ejemplo, para eliminar proteínas tóxicas como amiloide- β y Tau agregada en el cerebro. También se ha informado que la microglía puede actuar de manera neuroprotectora o reparadora en caso de trastornos neurológicos. Además, se ha demostrado que la microglía desempeña un papel importante en el mantenimiento de las redes neuronales, como la poda sináptica. Por otro lado, la microglía activada libera citoquinas inflamatorias e induce inflamación en el cerebro. Los avances recientes en la tecnología de análisis genético han dado lugar a informes de la existencia de varios subtipos microgliales, y la relación de cada subtipo microglial con las enfermedades es un tema para futuras investigaciones.

[0011]

Con respecto a la relación entre la microglía y la patología de Alzheimer, se informó que la microglía degenerada está asociada con la acumulación de Tau en inmunohistoquímica utilizando cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Bibliografía No Patentada 6). También hay un informe que identificó un subtipo de microglía disfuncional en la enfermedad de Alzheimer mediante inmunohistología (histología unicelular) (Bibliografía No Patentada 7). Sin embargo, no está claro cómo la microglía disfuncional modifica las enfermedades. Además, aunque la microglía disfuncional generalmente se identifica por su morfología, algunos investigadores se refieren a la microglía similar a la microglía disfuncional como "microglía degenerada" o "microglía envejecida" (Bibliografía No Patentada 8), y el significado de estos términos no ha sido

necesariamente establecido.

[0012]

También se han realizado análisis de imágenes cerebrales de pacientes con enfermedad de Alzheimer utilizando ligandos para TSPO (proteína translocadora), cuya expresión aumenta cuando se activa la microglía, y se informó que la señal detectada por TSPO–PET (Emisión de positrones (TSPO–PET) es mayor en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Bibliografía No Patentada 9) y se correlaciona con la enfermedad de Tau y la patología amiloide (Bibliografía No Patentada 10. Bibliografía No Patentada 11), y aún no se ha llegado a una opinión común.

[0013]

Recientemente, el análisis GWAS (Genome Wide Association Study) de la enfermedad de Alzheimer (Bibliografía No Patentada 12) reveló que muchos genes relacionados con la enfermedad se expresan en la microglía. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer dirigidos a la microglía están en marcha. Por ejemplo, los seres humanos con una mutación del gen de pérdida de función (LOF) (R47H), que provoca la pérdida de función de TREM2, tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Bibliografía No Patentada 13). Actualmente, se están realizando ensayos clínicos contra anticuerpos agonistas anti–TREM2 (Bibliografía No Patentada 14) y anticuerpos inhibidores anti–CD33 (Bibliografía No Patentada 15) que tienen la capacidad de activar la microglía (NCT04592874, NCT03822208), con la esperanza de que la activación de la microglía promoverá la eliminación de proteínas tóxicas como A β y de Tau como fármacos de anticuerpos candidatos para la microglía. Por otro lado, los anticuerpos anti–Sema4D (Bibliografía No Patentada 16), que inhiben la microglía activada en términos de supresión de la gliosis, también se encuentran en ensayos clínicos (NCT04381468).

[0014]

Recientemente, el análisis scRNAseq (secuenciación de ARN unicelular) de microglía en modelos de ratón con enfermedad de Alzheimer ha revelado la existencia de subtipos microgliales que aparecen asociados con la patología de Alzheimer. Dichos subtipos microgliales incluyen DAM (Microglía asociada a enfermedades, Bibliografía No Patentada 17), ARM (Microglía de respuesta activada, Bibliografía No Patentada 18) y MGnD (fenotipo neurodegenerativo microglial, Bibliografía No Patentada 19). Sin embargo, aún no está claro cómo estas microglías asociadas a la enfermedad modifican la enfermedad de Alzheimer, es decir, cómo ejercen sus efectos, ya que no hay forma de regular específicamente estas DAM y otras microglías asociadas a la enfermedad. Además, se desconoce cuáles de los subtipos de microglía específicos de la enfermedad que se han identificado suprimen la patogénesis y qué subtipos mejoran la patogénesis. Tampoco está

claro qué microglía disfuncional se clasifica o incluye dentro de qué subtipos, ya que los niveles de expresión de ARNm no brindan información directamente sobre si las células acumulan proteínas desnaturalizadas o no.

[0015]

4. gpNMB

La gpNMB (glucoproteína de melanoma no metastásico de proteína B) (también conocida como osteoactivina, DC-HIL, Bibliografía No Patentada 20) es una única glicoproteína transmembrana y tiene hasta 12 sitios de glicosilación en humanos. La gpNMB normalmente se expresa en orgánulos intracelulares (retículo endoplásmico, lisosomas, aparato de Golgi, melanosomas), etc. (Bibliografía No Patentada 21). Sin embargo, también se ha informado que la gpNMB se expresa en la membrana plasmática cuando se sobreexpresa (Bibliografía No Patentada 22). También se ha informado que la gpNMB se expresa en células cancerosas (Bibliografía No Patentada 23), y que el KLD (dominio similar a kringle) es importante para el crecimiento celular y que los motivos ITIM intracelulares inducen la señalización (Bibliografía No Patentada 24).

[0016]

La gpNMB tiene una región homóloga a la región CAF (fragmento de amiloide central) de la proteína familiar PMEL (proteína de premelanosoma) (Bibliografía No Patentada 25) (en lo sucesivo, el dominio central de amiloide) y el dominio PKD (homólogo de la enfermedad renal poliquística). El dominio PKD tiene una estructura de sándwich β formada por una lámina β que consta de tres cadenas y una lámina β que consta de cuatro cadenas que se pliegan entre sí. Se denominó dominio PKD porque es una estructura característica que posee la policistina-1, el gen responsable de la poliquistosis renal (Bibliografía No Patentada 26).

[0017]

La gpNMB es importante para la función de los fagosomas y lisosomas (Bibliografía No Patentada 27), ya que se ha informado que la función de los lisosomas está alterada en ratones deficientes en gpNMB (Bibliografía No Patentada 28). Se han informado anomalías del iris y el desarrollo de glaucoma en ratones que carecen de gpNMB (Bibliografía No Patentada 29), y se ha informado que los seres humanos que carecen de gpNMB tienen amiloidosis cutánea (Bibliografía No Patentada 30).

[0018]

Se sabe que gpNMB es escindido por proteasas de membrana como ADAM10 y liberado como gpNMB soluble (Bibliografía No Patentada 31), y se ha informado que la gpNMB soluble está involucrada en la neuroprotección (Bibliografía No Patentada 32), antiinflamación (Bibliografía No Patentada 31 – Bibliografía No Patentada 21) y

proliferación celular (Bibliografía No Patentada 33). También se ha informado que la función neural mejoró en ratones transgénicos que sobreexpresan la gpNMB soluble (región extracelular gpNMB) (Bibliografía No Patentada 34), y la función cognitiva aumentó en un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer (APP/PS1) cuando la autofagia mejoró usando vectores lentivirales para expresar la gpNMB (Bibliografía No Patentada 35).

[0019]

Por otro lado, se ha informado que la administración de un péptido de vacuna específico de gpNMB de ratón con algunas secuencias de aminoácidos de gpNMB de ratón reduce las células endoteliales vasculares y los fibroblastos envejecidos, mejora la resistencia a la insulina y la aterosclerosis en un modelo de ratón con carga de dieta alta en grasas, y prolonga la supervivencia en ratones con envejecimiento acelerado. También se ha informado que la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es importante en este proceso, y se han divulgado secuencias peptídicas parciales de gpNMB que son eficaces para eliminar células senescentes (Bibliografía patentada 1, Bibliografía No Patentada 36). Del mismo modo, se ha informado que la administración de un anticuerpo policlonal contra gpNMB de ratón en un modelo de ratón cargado con una dieta rica en grasas mejoró la obesidad y la resistencia a la insulina al inhibir la gpNMB soluble producida por el hígado (Bibliografía No Patentada 37).

[0020]

Glembatumumab (Bibliografía patentada 2), un anticuerpo humano específico de la gpNMB antihumana, se conoce como anticuerpo anti-gpNMB. Glembatumumab Vedotina, un conjugado de Glembatumumab y un fármaco contra el cáncer, avanzó a los ensayos de Fase II como un posible fármaco contra el cáncer, pero su desarrollo se interrumpió. También se ha descrito otro anticuerpo anti-gpNMB que se une a la gpNMB expresada en la superficie de las células cancerosas y trata el cáncer con inmunotoxinas (Bibliografía patentada 3). También hay un informe sobre la adquisición de otro anticuerpo específico de gpNMB antihumana, que describe aplicaciones diagnósticas y terapéuticas contra células cancerosas derivadas de humanos (Bibliografía No Patentada 38). También se han informado anticuerpos específicos anti-gpNMB de rata específicos para la microglía de rata activada (Bibliografía No Patentada 39). También se ha informado que los anticuerpos específicos anti-DC-HIL de ratón envían señales a las células (Bibliografía No Patentada 40).

[0021]

Con respecto a la expresión de gpNMB en la enfermedad de Alzheimer (AD), se han informado análisis de inmunohistoquímica y expresión de ARN y concentraciones en líquido cefalorraquídeo. Con respecto a la inmunohistoquímica, se informó la acumulación de microglía que expresa gpNMB en placas A β positivas para ApoE en los cerebros de pacientes con AD (Bibliografía No Patentada 41).

[0022]

Con respecto a la expresión de ARN, el análisis de scRNAseq de ratones AppNL–GF mostró que los subtipos de microglía se clasificaron en Microglía de Respuesta Activada (ARM), que son genes de reparación de tejidos como gpNMB, etc., y se ha reportado mayor producción de TREM2 y menor producción de CD33 (Literatura No Patentada 18). También ha habido un informe de que la expresión de gpNMB está regulada positivamente en MGnD en 5XFAD, un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, lo que sugiere que puede tener un papel neuroprotector (Bibliografía No Patentada 19). Por otro lado, se ha informado que el análisis de scRNAseq de ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer mostró la expresión de gpNMB en microglía con mal funcionamiento (Bibliografía No Patentada 42). También ha habido un informe de que snRNAseq (secuenciación de ARN de un solo núcleo) utilizando muestras de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer mostró la expresión de ApoE4, TREM2, ITGAX, GPNMB, FLT1, SPP1, etc., en microglía activada con capacidad fagocítica, que se cree que funcionan para eliminar proteínas tóxicas (Bibliografía No Patentada 43). También se ha informado de la asociación de la microglía de tipo 1 con la enfermedad de Alzheimer y la posible doble función de gpNMB (Bibliografía No Patentada 44). Sin embargo, se sabe que existen muchos subtipos microgliales, como se muestra en la Bibliografía No Patentada 18 y la Bibliografía No Patentada 43.

[0023]

Además, se ha informado que gpNMB está involucrado en la función de autofagia, reduce la deposición de A β en ratones del modelo de AD (APP–PS1) y mejora la función cognitiva, como lo demuestra la prueba del laberinto acuático de Morris (Bibliografía No Patentada 44).

[0024]

En cuanto a la relación entre las concentraciones de gpNMB soluble en líquido cefalorraquídeo y la enfermedad de Alzheimer, algunos informes (Bibliografía No Patentada 19) indican que las concentraciones están aumentadas en la AD, mientras que otros (Bibliografía No Patentada 45) indican que no existe relación.

[0025]

5. Ratón del modelo de la enfermedad de Alzheimer

Se han desarrollado diversos modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer, que se utilizan actualmente en investigación (Bibliografía No Patentada 46). Un modelo de ratón representativo es el ratón 5XFAD (Bibliografía No Patentada 47), que produce oligómeros de A β , que se consideran la forma más tóxica de amiloide– β , y también acumula oligómeros de A β en las neuronas. El ratón APPosk (Bibliografía No Patentada

48) es otro modelo de ratón que acumula oligómeros de A β en las neuronas, como el modelo de ratón 5XFAD, y se ha informado que mejora la patología, restaura el número de sinapsis y mejora la función cognitiva después de la administración intranasal de rifampicina (Bibliografía No Patentada 49). Sin embargo, no ha habido informes de eliminación de oligómeros de A β acumulados intracelularmente por anticuerpos tales como anticuerpos anti-A β . Tampoco ha habido informes de anticuerpos que mostraran la recuperación del número de sinapsis en las neuronas, un indicador de la función neuronal y la neurotransmisión.

[0026]

Tg2576 es un ratón Tg que sobreexpresa el gen somático mutante sueco (KM670/671NL) del gen APP (proteína precursora de amiloide, isoforma 695). Tg2576 es un ratón modelo para la AD que presenta placas amiloides (placas seniles en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer) aproximadamente a los 9 meses de edad (Bibliografía No Patentada 50), y se usa para estudios de propósito general de la patología amiloide.

[0027]

Tau264 es un ratón Tg que expresa Tau humano. Aunque no presenta la patología Tau por sí mismo, se ha informado que su cruzamiento con ratones APP^{sk} induce la acumulación de tau fosforilada (Bibliografía No Patentada 51), y se considera un ratón modelo con una patología similar a la enfermedad de Alzheimer humana, ya que Ti presenta fosforilación y acumulación de Tau de tipo salvaje sin mutaciones.

[0028]

6. Evaluación de la función nerviosa

La recuperación de las funciones neuronales, como la función de referencia espacial y las funciones de memoria, generalmente se evalúa *in vivo* mediante pruebas de comportamiento, como la prueba del laberinto acuático de Morris, el laberinto en Y, y la búsqueda de sustancias novedosas.

[0029]

La evaluación *in vitro* del número de neuronas se lleva a cabo comúnmente mediante tinción inmunohistoquímica, como la tinción NeuN, que es un indicador del número de neuronas, y la tinción de sinaptofisina, que es un indicador del número de sinapsis.

[0030]

En muchos modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer, la evaluación se realiza en un estado que no conduce a la muerte de las células neuronales y, por lo tanto, la

evaluación de las funciones neuronales se lleva a cabo mediante el análisis del número de sinapsis mediante tinción con sinaptofisina.

[0031]

Muchos trabajos de investigación han informado una correlación entre los niveles de sinaptofisina *in vitro* y las funciones neurológicas *in vivo* (Bibliografía No Patentada 53, Bibliografía No Patentada 54 y Bibliografía No Patentada 55), y la cuantificación de la proteína sinaptofisina por tinción de sinaptofisina u otros medios puede utilizarse para evaluar la recuperación de las funciones neurológicas.

LISTA DE CITAS

Bibliografía Patentada

[0032]

[Bibliografía Patentada 1] WO2021/020047 A

[Bibliografía Patentada 2] JP6334496 A

[Bibliografía Patentada 3] WO2007/053718 A

Bibliografía No Patentada

[0033]

[Bibliografía No Patentada 1] Avgerinos *et al.*, Ageing Res. Rev., (2021), 68:101339

[Bibliografía No Patentada 2] Tolar *et al.*, Int. J. Mol. Sci. (2021), 22[12]:6355

[Bibliografía No Patentada 3] Jeremic *et al.*, Ageing Res. Rev., (2021), 72:101496

[Bibliografía No Patentada 4] Ji *et al.*, Drugs, (2021), 81[10]:1135–1152

[Bibliografía No Patentada 5] Pardridge *et al.*, Pharmaceuticals (2022), 15[3], Internet <<https://doi.org/10.3390/ph15010003>>

[Bibliografía No Patentada 6] Streit *et al.*, Acta Neuropathol., (2009), 118[4]:475–85

[Bibliografía No Patentada 7] Swanson *et al.*, Acta Neuropathol. Commun., (2020), 8:170

[Bibliografía No Patentada 8] Shahidehpour *et al.*, Neurobiol. Aging., (2021), 99:19–27

[Bibliografía No Patentada 9] Malpetti *et al.*, Brain, (2020), 143:1588–1602

[Bibliografía No Patentada 10] Dani *et al.*, Brain, (2018), 141[9]:2740–2754

[Bibliografía No Patentada 11] Gouilly *et al.*, Eur. J. Neurosci., (2022), doi: 10.1111/ejn.15613

[Bibliografía No Patentada 12] Jansen *et al.*, Nat. Genet., (2019), 51[3]:404–413

- [Bibliografía No Patentada 13] Wang *et al.*, Cell, (2015), 160[6]:1061–1071
- [Bibliografía No Patentada 14] Wang *et al.*, J. Exp. Med., (2020), .217[9]:e20200785
- [Bibliografía No Patentada 15] Griciuc *et al.*, Curr. Opin. Neurol., (2021), 34[2]:228–236
- [Bibliografía No Patentada 16] Mao *et al.*, Int. J. Mol. Sci., (2021), 22:9465
- [Bibliografía No Patentada 17] Keren-Shaul *et al.*, Cell, (2017), 169:1276–1290
- [Bibliografía No Patentada 18] Frigerio *et al.*, Cell Rep., (2019), .27[4]:1293–1306
- [Bibliografía No Patentada 19] Huettenrauch *et al.*, Acta Neuropathol. Commun., (2018), 6:108
- [Bibliografía No Patentada 20] Shikano *et al.*, J. Biol. Chem., (2001), 276[11]:8125–8134
- [Bibliografía No Patentada 21] Ripoll *et al.*, J. Immunol., (2007), 178:6557–6566
- [Bibliografía No Patentada 22] Tse *et al.*, Clin. Cancer Res., (2006), 12[4]:1373–1382
- [Bibliografía No Patentada 23] Maric *et al.*, OncoTargets Ther., (2013), 6:839–852
- [Bibliografía No Patentada 24] Xie *et al.*, Cancer Sci., (2019), 110[7]:2237–2246
- [Bibliografía No Patentada 25] Hee *et al.*, Scientific Reports, (2017), 7:44064
- [Bibliografía No Patentada 26] Bycroft *et al.*, EMBO J., (1999), 18[2]:297–305
- [Bibliografía No Patentada 27] Li *et al.*, FASEB J., (2010), 24[12]:4767–4781
- [Bibliografía No Patentada 28] Robinet *et al.*, Scientific Reports, (2021), 11:10249
- [Bibliografía No Patentada 29] Anderson *et al.*, Nat. Genet., (2002), 30:81–85
- [Bibliografía No Patentada 30] Yang *et al.*, Am. J. Hum. Genet., (2018), 102[2]:219–232
- [Bibliografía No Patentada 31] Rose *et al.*, PLoS One, (2010), 5[8]:e12093
- [Bibliografía No Patentada 32] Nakano *et al.*, Neuroscience, (2014), 277:123–131
- [Bibliografía No Patentada 33] Wang *et al.*, Cancer Sci., (2021), 112:4187–4197
- [Bibliografía No Patentada 34] Murata *et al.*, J. Neurochem., (2015), 132:583–594
- [Bibliografía No Patentada 35] Zhu *et al.*, Neurosci. Lett., (2022), 767:136300
- [Bibliografía No Patentada 36] Suda *et al.*, Nat. Aging, (2021), 1:1117–1126
- [Bibliografía No Patentada 37] Gong *et al.*, Nat. Metab., (2019), 1[5]:570–583
- [Bibliografía No Patentada 38] FBRI LLC, "ALZFORUM: NETWORKING FOR A CURE", "RESEARCH MODELS", [online], (1996), [Seached in 2022], Internet <<https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>>
- [Bibliografía No Patentada 39] Zhang *et al.*, Monoclon. Antibodies Immunodiagn. Immunother., (2013), .32[4]:265–269
- [Bibliografía No Patentada 40] Kawahara *et al.*, Glia, (2016), 64[11]:1938–1961
- [Bibliografía No Patentada 41] Chung *et al.*, J. Immunol., (2019), 183[5]:5190–

5198

[Bibliografía No Patentada 42] Satoh *et al.*, *Intractable Rare Dis. Res.*, (2019), 8[2]:120–128

[Bibliografía No Patentada 43] Krasemann *et al.*, *Immunity*, (2017), 47:566–581

[Bibliografía No Patentada 44] Gerrits *et al.*, *Acta Neuropathol.*, (2021), 141:681–696

[Bibliografía No Patentada 45] Zhu *et al.*, *Neuroscience Letters*, (2022), 767:136300

[Bibliografía No Patentada 46] Kawahara, *Monthly "Cell,"* (2022), 54[2]:110–114

[Bibliografía No Patentada 47] Aichholzer *et al.*, *Alzheimers Res. Ther.*, (2021), 13:94

[Bibliografía No Patentada 48] Oakley *et al.*, *J. Neurosci.*, (2006), 26[40]:10129–10140

[Bibliografía No Patentada 49] Umeda *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, (2011), 89:1031–1042

[Bibliografía No Patentada 50] Umeda *et al.*, *Front. Neurosci.*, (2021), 15:763476

[Bibliografía No Patentada 51] Hsiao *et al.*, *Science*, (1996), 274[5284]:99–102

[Bibliografía No Patentada 52] Umeda *et al.*, *Acta Neuropathol.*, (2014), 127:685–698

[Bibliografía No Patentada 53] Shi *et al.*, *Front. Pharmacol.*, (2021), 12:794458

[Bibliografía No Patentada 54] Umeda *et al.*, *Front. Neurosci.*, (2021), 15:763476

[Bibliografía No Patentada 55] Hafez *et al.*, *Neuroscience*, (2012), 223:465–472

[Bibliografía No Patentada 56] EMBL–EBI, "AlphaFold Protein Structure Database", "Transmembrane glycoprotein NMB", [online], (2021), [Seached in 2022], Internet <<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q99P91>>

[Bibliografía No Patentada 57] Woollacott *et al.*, *J. Neuroinflammation*, (2020), 17:234

[Bibliografía No Patentada 58] Kushwaha *et al.*, *Ann. Neurosci.*, (2018), 25:223–233

[Bibliografía No Patentada 59] Swanson *et al.*, *Acta Neuropathol. Commun.*, (2020), 8:170

[Bibliografía No Patentada 60] Quek *et al.*, *J. Neuroinflammation*, (2022), 19:58

[Bibliografía No Patentada 61] Boi *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, (2020), 21[22]:8535

[Bibliografía No Patentada 62] Ishijima *et al.*, *Science Progress*, (2021), 104[4]:1–21

[Bibliografía No Patentada 63] Cai *et al.*, *Bioengineered*, (2021), 12[2]:11390–11398

[Bibliografía No Patentada 64] Paasila *et al.*, *Brain Pathology*, (2019), 29:726–740

[Bibliografía No Patentada 65] Hajj *et al.*, *J. Neuroinflammation*, (2019), 16:87

[Bibliografía No Patentada 66] Stratoulis *et al.*, *EMBO J.*, (2019), 38:e101997

[Bibliografía No Patentada 67] Anderson *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. (2013), 26[4]:470–486

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

PROBLEMA A RESOLVER CON LA INVENCIÓN

[0034]

Existen algunos fármacos que mejoran los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas, pero no ha habido fármacos terapéuticos. Por otro lado, scRNAseq y otros métodos han revelado la existencia de microglía asociadas a enfermedades que aparecen específicamente en enfermedades neurodegenerativas, pero no está claro qué microglía es responsable de la progresión de la enfermedad. Tampoco está claro si la identificación y la eliminación específica de la microglía de mal funcionamiento causante de enfermedad conduciría a efectos terapéuticos como la eliminación de proteínas tóxicas en las neuronas y la restauración de la función neuronal.

[0035]

En este contexto, como se describe en la sección TÉCNICA ANTECEDENTE anterior, aunque gpNMB es uno de los genes expresados en la microglía de mal funcionamiento que está involucrada en la función del autofagosoma y el lisosoma, no está claro si la microglía con alto contenido de gpNMB está involucrada en la patogénesis de la enfermedad o no, o incluso si son patógenas o protectoras.

[0036]

Como se mencionó anteriormente, se ha informado la presencia de microglía asociada a la enfermedad en varios modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, no estaba claro cómo la microglía asociada a la enfermedad modula la enfermedad, ya que no había forma de regular específicamente la microglía asociada a la enfermedad.

[0037]

Aunque se ha informado que los gpNMB expresados en la microglía asociada a la enfermedad actúan de manera neuroprotectora y que se expresan en la microglía con mal funcionamiento, como se describió anteriormente, no ha habido informes de anticuerpos monoclonales anti-gpNMB que se unan con alta afinidad bajo condiciones fisiológicas *in vivo*, que puedan administrarse a modelos animales de enfermedades para evaluar su eficacia. Además, no ha habido informes de que se hayan administrado anticuerpos monoclonales anti-gpNMB de alta afinidad, que pueden actuar en el cerebro, a un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer para analizar sus efectos.

[0038]

gpNMB es una glicoproteína rica en glicanos, con 12 sitios de glicosilación en humanos. Por lo tanto, no es fácil crear anticuerpos monoclonales que puedan reconocer gpNMB expresadas en las células y, como se mencionó anteriormente, los ensayos clínicos realizados hasta ahora fueron los de glembatumumab vedotina, un conjugado de glembatumumab y un fármaco contra el cáncer, y solo se han realizado para tipos de cáncer con alta expresión de gpNMB (melanoma, cáncer de mama, etc.). Debido a que glenvatumumab es un anticuerpo específico de gpNMB humana, no fue posible evaluar su efecto sobre la gpNMB endógena en modelos de enfermedad en ratones o ratas.

[0039]

Por otro lado, ha habido informes de mejora de la obesidad y la resistencia a la insulina en modelos de ratón cargados con una dieta rica en grasas mediante la inhibición de la gpNMB soluble expresada en el hígado con un anticuerpo policlonal anti-gpNMB de ratón (Bibliografía No Patentada 38) y mejora de la aterosclerosis y la resistencia a la insulina y prolongación de la supervivencia en ratones modelo de envejecimiento acelerado mediante la eliminación de células senescentes con una vacuna peptídica específica de gpNMB de ratón (Bibliografía Patentada 35 y Bibliografía No Patentada 36).

[0040]

Con respecto a la producción de anticuerpos anti-gpNMB con reactividad cruzada ratón-humano con el fin de desarrollar un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer, no ha habido informes hasta la fecha como se mencionó anteriormente, ya que gpNMB tiene una gran cantidad de sitios de glicosilación, una homología de tan solo aproximadamente el 70% entre ratón y ser humano, y una conformación compleja (Bibliografía No Patentada 56), lo que hace que el intento de obtener anticuerpos que reconozcan la conformación *in vivo* constituya un desafío. Además, debido a que la modificación de los glicanos difiere según las células y los tejidos en los que se expresan, se supuso que era extremadamente difícil obtener anticuerpos que se unieran específicamente a las gpNMB expresadas en la microglía, e incluso más difícil crear anticuerpos anti-gpNMB que se unan a gpNMB expresadas en la membrana celular y que tengan reactividad cruzada ratón/humano.

[0041]

La presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio para regular específicamente la microglía con mal funcionamiento, y también proporcionar una droga farmacéutica basada en un nuevo mecanismo de acción utilizando dichos medios.

MEDIOS PARA SOLUCIONAR EL PROBLEMA

[0042]

Los presentes inventores habían confirmado la presencia de microglía con acumulación intracelular de A β , Tau o α -sinucleína en modelos de ratón con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

[0043]

También ha habido un informe de un método para puntuar el nivel de degeneración (disfunción) basado en la estructura ramificada de la Bibliografía No Patentada 57), donde estas microglías tenían una estructura ramificada reducida en morfología y se evaluaron como degeneradas. Además, también se observó acumulación de lipofusina, que se observa en las células senescentes. Estos hallazgos sugieren que estas microglías son microglías con mal funcionamiento que no pueden degradar las proteínas de agregación. Se ha propuesto que dichas proteínas agregadas que acumulan microglía con mal funcionamiento pierden sus efectos neuroprotectores y fagocitosis, lo que conduce a patologías neurodegenerativas (Bibliografía No Patentada 58 y Bibliografía No Patentada 59).

[0044]

Los presentes inventores también han descubierto que la mayoría de estas microglías con mal funcionamiento son positivas para gpNMB, es decir, células que se tiñen dos veces mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-gpNMB y anti-Iba1. Por ejemplo, basándose en el análisis inmunohistológico del cerebro de ratones APP^{osk}, los inventores encontraron que las células positivas para gpNMB con acumulación intracelular de A β eran células positivas para anticuerpos anti-gpNMB y anti-Iba1, es decir, microglía con alta expresión de gpNMB. El término “microglía con mal funcionamiento” en el presente documento se refiere a una célula que se tiñe por duplicado por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-gpNMB y anti-Iba1.

[0045]

Aunque los investigadores no siempre están de acuerdo en lo que se entiende por “microglía con mal funcionamiento” como se mencionó anteriormente, el término “microglía con mal funcionamiento”, tal como se usa en este documento, se refiere a microglía que tiene al menos una de las siguientes características.

- (1) Sus funciones fagocíticas y/o proteolíticas tóxicas son reducidas o aumentadas anormalmente.
- (2) Liberan citoquinas proinflamatorias que pueden hacer progresar enfermedades (por ejemplo, inflamación del cerebro).
- (3) Tienen estructuras ramificadas reducidas en comparación con la microglía normal.

[0046]

Entre estos, la primera característica (1) puede confirmarse por el hecho de que se sabe que una variedad de proteínas agregadas están sujetas a fagocitosis, que varían según la enfermedad, por ejemplo, A β , tau, alfa-sinucleína, lipofuscina, L-ferritina, TDP43, SOD, proteínas poliglutamato, y se observa su acumulación en la microglía (Bibliografía No Patentada 60 y Bibliografía No Patentada 61). Específicamente, esta característica puede identificarse por tinción con Iba1, un marcador de microglía, así como por detección con anticuerpos contra proteínas de agregación (por ejemplo, anticuerpos anti-A β o anti-tau) o por autofluorescencia (lipofuscina). La segunda característica (2) puede ser confirmada por la detección de las citoquinas en cuestión (Bibliografía No Patentada 62 y Bibliografía No Patentada 63). La tercera característica (3) puede confirmarse por tinción inmunohistoquímica (Bibliografía No Patentada 64) y observación morfológica usando microscopía electrónica (Bibliografía No Patentada 65) (Bibliografía No Patentada 66).

[0047]

Por otro lado, el término “microglía normal” que se usa en el presente documento se refiere a microglía que no tiene ninguna de las características antes mencionadas de microglía con mal funcionamiento y que trabaja para mantener la homeostasis en el cuerpo.

[0048]

A través de intensas investigaciones en vista de los antecedentes anteriores, los presentes inventores han logrado obtener anticuerpos anti-gpNMB que se unen específicamente a al menos un sitio en una región de un dominio tipo PMEL-CAF a un dominio PKD de gpNMB humana, y han encontrado que estos anticuerpos tienen funciones inesperadas, por ejemplo, los efectos de disminuir el número de microglía con mal funcionamiento en un sujeto y/o eliminar oligómeros β amiloides en un sujeto y/o aumentar el número de sinapsis en un sujeto y/o restaurar funciones cognitivas, y pueden usarse para una variedad de aplicaciones basadas en estas funciones, por ejemplo, para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas en un sujeto. Los presentes inventores también han descubierto que el uso de cualquier medio para reducir el número de microglía disfuncionales, como los anticuerpos, hace posible lograr efectos inesperados, por ejemplo, los efectos de disminuir el número de microglía con mal funcionamiento en un sujeto y/o eliminar oligómeros β amiloides en un sujeto y/o aumentar el número de sinapsis en un sujeto y/o restaurar funciones cognitivas, e incluso el efecto inesperado de tratar o prevenir diversas enfermedades neurodegenerativas. Basándose en estos descubrimientos, los inventores han completado las siguientes invenciones.

[0049]

Específicamente, los aspectos de la presente invención incluyen lo siguiente.

[Aspecto 1] Un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo que se une específicamente a al menos un sitio en una región de un dominio tipo PMEL-CAF (tipo fragmento amiloide de núcleo PMEL) con un dominio PKD de gpNMB humana (glicoproteína proteína B de melanoma no metastásico).

[Aspecto 2] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que se une específicamente a una región que contiene los residuos de aminoácidos D287 y/o H301 de gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209.

[Aspecto 3] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que se une específicamente a una región que contiene los residuos de aminoácidos R214 y/o R215 de gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209.

[Aspecto 4] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, que también se une específicamente a una o más regiones seleccionadas de una región que contiene los residuos de aminoácidos K257 y/o D258, una región que contiene los residuos de aminoácidos H268 y/o D269, una región que contiene un residuo de aminoácido K282, una región que contiene un residuo de aminoácido K316, y una región que contiene los residuos de aminoácidos H216 y/o R218, de gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209.

[Aspecto 5] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que también se une específicamente a al menos un sitio en una región de un dominio tipo PMEL-CAF con un dominio PKD de gpNMB de ratón.

[Aspecto 6] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una o más actividades seleccionadas de: una actividad de reducir el número de microglía con mal funcionamiento; una actividad de eliminar oligómeros beta amiloides; una actividad de aumentar el número de sinapsis; y una actividad de restaurar la función cognitiva.

[Aspecto 7] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un anticuerpo monoclonal o su fragmento o un derivado del mismo.

[Aspecto 8] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende:

(1) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 1, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 1 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 1,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 3, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 3 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 3, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 5, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 5 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 75,0% o más, 83,3% o más, o 91,6% o más con SEQ ID NO 5, o

(2) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 17, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 17 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 17,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 19, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 19 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 19, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 21, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 21 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 21, o

(3) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 33, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 33 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 33,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 35, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 35 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 35, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 37, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 37 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o

más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 37, o

(4) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 49, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 49 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 49,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 51, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 51 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 51, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 53, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 53 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 68,7% o más, 75,0% o más, 81,2% o más, 87,5% o más, o 93,7% o más con SEQ ID NO 53, o

(5) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 65, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 65 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 65,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 67, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 67 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 67, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 69, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 69 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 78,5% o más, 85,7% o más, o 92,8% o más con SEQ ID NO 69, o

(6) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 81, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 81 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 81,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 83, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 83 por sustitución, delección o inserción

de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 83, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 85, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 85 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 85, o

(7) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 97, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 97 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 97,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 99, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 99 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 99, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 101, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 101 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 101, o

(8) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 113, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 113 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 113,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 115, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 115 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 115, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 117, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 117 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 117, o

(9) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 129, o

una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 129 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 129, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 131, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 131 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 131, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 133, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 133 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 133, o

(10) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 145, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 145 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 145, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 147, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 147 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 147, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 149, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 149 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 149, o

(11) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 161, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 161 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 161, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 163, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 163 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u

85,7% o más con SEQ ID NO 163, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 165, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 165 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 165,

(12) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 287, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 287 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más 87,5% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 287,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 289, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 289 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 289, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 291, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 291 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 291, o

(13) como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 17, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 17 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos distintos de asparagina en la posición 32 y triptófano en la posición 33,

como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 19, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 19 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos distintos de ácido aspártico en la posición 55, fenilalanina en la posición 57, y treonina en la posición 58, y

como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 21, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 21 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce residuos de aminoácidos distintos de arginina en la posición 98, glicina en la posición 100, y glicina en la posición 109.

[Aspecto 9] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una región variable de cadena pesada que comprende:

(1) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 13, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 13, o

- (2) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 29, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 29, o
- (3) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 45, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 45, o
- (4) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 61, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 61, o
- (5) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 77, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 77, o
- (6) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 93, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 93, o
- (7) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 109, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 109, o
- (8) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 125, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 125, o
- (9) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 141, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 141, o
- (10) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 157, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 157, o
- (11) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 173, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 173, o
- (12) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 299, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 299.

[Aspecto 10] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la región variable de cadena pesada comprende, como secuencia de marco, una secuencia de marco de cualquier clase de inmunoglobulina humana.

[Aspecto 11] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además comprende una región constante de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de cualquier clase de inmunoglobulina humana.

[Aspecto 12] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende al menos una región variable de cadena liviana que comprende:

(1) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 7, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 7 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 7,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 9, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 9 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología

(preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 9, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 11, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 11 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 11, o

(2) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 23, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 23 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 23,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 25, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 25 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 25, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 27, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 27 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más, o

(3) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 39, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 39 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 39,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 41, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 41 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 41, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 43, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 43 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 43, o

(4) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 55, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 55 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 55,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 57, o una secuencia

de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 57 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 57, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 59, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 59 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 59, o

(5) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 71, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 71 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 71,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 73, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 73 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 73, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 75, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 75 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 75, o

(6) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 87, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 87 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 87,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 89, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 89 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 89, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 91, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 91 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 91, o

(7) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 103, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 103 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u

83,3% o más con SEQ ID NO 103,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 105, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 105 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 105, y
como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 107, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 107 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 107, o

(8) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 119, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 119 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 119,
como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 121, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 121 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 121, y
como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 123, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 123 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 123, o

(9) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 135, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 135 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 135,
como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 137, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 137 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 137, y
como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 139, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 139 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 139, o

(10) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 151, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 151 por sustitución, delección o

inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 151, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 153, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 153 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 153, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 155, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 155 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 155, o

(11) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 167, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 167 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 167, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 169, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 169 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 169, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 171, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 171 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 171, o

(12) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 293, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 293 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más o 90,9% o más con SEQ ID NO 293, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 295, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 295 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 295, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 297, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 297 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 297, o

(13) como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 23, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 23 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos distintos de isoleucina en la posición 29 y tirosina en la posición 31,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 25, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 25 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos distintos de treonina en el Nro. 50, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 27, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 27 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos distintos de histidina en la posición 88, glutamina en la posición 89, triptófano en la posición 90, serina en la posición 92, y tirosina en la posición 93.

[Aspecto 13] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende al menos una región variable de cadena liviana que comprende:

- (1) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 15, o
- (2) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 31, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 31, o
- (3) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 47, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 47, o
- (4) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 63, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 63, o
- (5) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 79, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 79, o
- (6) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 95, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 95, o
- (7) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 111, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 111, o
- (8) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 127, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 127, o
- (9) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 143, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 143, o
- (10) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 159, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 159, o
- (11) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 175, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 175, o
- (12) la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 301, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología del 60% o más con SEQ ID NO 301.

[Aspecto 14] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de

acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la región variable de cadena liviana comprende, como secuencia de marco, una secuencia de marco de cualquier clase de inmunoglobulina humana.

[Aspecto 15] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que además comprende una región constante de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena liviana de cualquier clase de inmunoglobulina humana.

[Aspecto 16] El anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es un Fab, scFv, Diacuerpo, Nanocuerpo, VHH, anticuerpo biespecífico o anticuerpo multiespecífico, o un derivado del mismo.

[Aspecto 17] Un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo que se une a al menos un sitio en una región de un dominio tipo PMEL-CAF con un dominio PKD competitivamente con un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

[Aspecto 18] Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.

[Aspecto 19] Un vector de clonación o vector de expresión que tiene al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18.

[Aspecto 20] Una célula recombinante transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 19.

[Aspecto 21] Un método para producir un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende cultivar una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 20.

[Aspecto 22] Un método para producir un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende: administrar a un animal un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región que contiene los residuos de aminoácidos D287 y/o H301 y/o una región que contiene los residuos de aminoácidos R214 y/o R215 de gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209; y recolectar un anticuerpo o su fragmento o un derivado del mismo producido en el cuerpo del animal.

[Aspecto 23] Una vacuna que tiene una actividad para estimular la producción de un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una región que contiene los residuos de aminoácidos D287 y/o H301 y/o una región que contiene los residuos de aminoácidos R214 y/o R215 de gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209.

[Aspecto 24] Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, uno o más seleccionados del grupo que consiste en un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento

o un derivado del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18, un vector de acuerdo con la reivindicación 19, y una célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 20.

[Aspecto 25] La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 24, para usar en la disminución del número de microglía con mal funcionamiento en un sujeto y/o eliminar oligómeros β amiloides en un sujeto y/o aumentar el número de sinapsis en un sujeto y/o tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas en un sujeto.

[Aspecto 26] Una composición farmacéutica para eliminar oligómeros β amiloides en un sujeto y/o aumentar el número de sinapsis en un sujeto y/o tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas en un sujeto, que comprende, como ingrediente activo, un agente para disminuir el número de microglía con mal funcionamiento.

[Aspecto 27] La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, en donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

[Aspecto 28] La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 27, que además comprende un segundo ingrediente activo.

[Aspecto 29] La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el segundo ingrediente activo es uno o más seleccionado de un anticuerpo anti-Tau, anticuerpo anti- β amiloide, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-semaforina 4D, anticuerpo anti-TNF α , anticuerpo anti-sortilina, anticuerpo anti-lectina específica de galactosa (galectina) 3, y anticuerpo anti-TREM2 (receptor desencadenante expresado en células mieloides 2).

[Aspecto 30] La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el segundo ingrediente activo es una vacuna que comprende un polipéptido de longitud completa o longitud parcial de una o más proteínas seleccionadas de Tau, β amiloide, CD33, semaforina 4D, TNF α , sortilina, lectina específica de galactosa (galectina) 3 y TREM2 (receptor desencadenante expresado en células mieloides 2), o un ácido nucleico que codifica el polipéptido.

[0050]

El término “fármaco farmacéutico” utilizado en este documento debe interpretarse como que abarca los conceptos de “agente terapéutico” y “agente profiláctico”, a menos que sea inconsistente con el contexto.

EFEECTO DE LA INVENCION

[0051]

Los anticuerpos anti-gpNMB de la presente invención pueden exhibir efectos extremadamente inesperados, por ejemplo, los efectos de la disminución del número de microglías de funcionamiento deficiente en un sujeto, y/o la eliminación de oligómeros β amiloides, y/o el aumento del número de sinapsis en un sujeto, y/o el restablecimiento de

las funciones cognitivas, mediante de la unión específica con al menos un sitio, en una región de un dominio similar a PMEL-CAF, a un domino PKD de la gpNMB humana. El uso de tales anticuerpos anti-gpNMB también proporcionará fármacos para tratar o prevenir diversas enfermedades neurodegenerativas basadas en nuevos mecanismos de acción.

BREVE EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS

[0052]

[Figura 1] La Figura 1 muestra la alienación de una secuencia de aminoácidos de la gpNMB humana (isotipo a) y gpNMB de ratón, en los cuales la región de los residuos de aminoácidos 256 a 319 se muestra con líneas punteadas, como un ejemplo del dominio PKD, y la región de residuos de aminoácidos 172 a 246 se muestra con líneas continuas, como un ejemplo del dominio similar a PMEL-CAF.

[Figura 2] La Figura 2 muestra fotografías inmunoteñidas que indican el efecto de la administración de anticuerpos anti-gpNMB (GPN05-1 y GPN06-1) en la reducción de microglías positivas a gpNMB en ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer.

(A) Control, (B) Grupo tratado con GPN05-1, y (C) Grupo tratado con GPN06-1. I: hemisferio cerebral izquierdo, R: hemisferio cerebral derecho, sectores GD: giro dentado, CA: cornu ammonis, CA3: región CA3 hipocampo, CA 23: áreas CA2-CA3 hipocampo, Ent: corteza entorrinal, PPTA: corteza somatosensorial cortical.

[Figura 3] La Figura 3 es un gráfico que muestra el análisis estadístico de las fotografías inmunoteñidas en la Figura 2.

[Figure 4] La Figura 4 muestra fotografías inmunoteñidas que indican el efecto de la administración de anticuerpos anti-gpNMB (GPN05-1 y GPN06-1) en la eliminación de oligómeros A β en ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer. (A) Control, (B) Grupo tratado con GPN05-1 y (C) Grupo tratado con GPN06-1.

[Figura 5] La Figura 5 muestra fotografías inmunoteñidas que indican el efecto de la administración de anticuerpos anti-gpNMB (GPN05-1 y GPN06-1) en el restablecimiento de sinapsis en ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer. (A) Control 1 (ratones no Tg), (B) Control 2 (ratones APPosk), (C) Grupo tratado con GPN05-1 y (D) Grupo tratado con GPN06-1.

[Figura 6] La Figura 6 muestra fotografías inmunoteñidas de las secciones del cerebro de ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer después de la administración de anticuerpos. (A) Grupo de control tratado con anticuerpo 11E10, (B) Grupo tratado con GPN09-1, (C) Grupo tratado con GPN11-10, (D) Grupo tratado con GPN15-2, (E) Grupo tratado con GPN15-3 y (F) Grupo tratado con GPN18-2.

[Figura 7] La Figura 7 es un gráfico que muestra el análisis estadístico de las fotografías inmunoteñidas en la Figura 6.

[Figura 8] La Figura 8 muestra fotografías teñidas que indican el efecto de la

administración de un anticuerpo anti-gpNMB (GPN18-2) en el restablecimiento de sinapsis en ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer. (A) Control (ratones no Tg) y (B) grupo tratado con GPN18-2.

[Figura 9] La Figura 9 muestra fotografía inmunoteñidas de las secciones del cerebro de ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer después de la administración de anticuerpos. (A) Grupo de control tratado con anticuerpos, (B) Grupo tratado con GPN18-2, (C) Grupo tratado con GPN06-1, (D) Grupo tratado con GPN18-5 y (E) Grupo tratado con 1-5E.

[Figura 10] La Figura 10 es un gráfico que muestra el análisis estadístico de las fotografías inmunoteñidas en la Figura 9.

[Figura 11] La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de la prueba del laberinto acuático de Morris (Prueba de adquisición) con ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer tratados con anticuerpos anti-gpNMB (GPN06-1 y GPN18-2).

[Figura 12] La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de la prueba del laberinto acuático de Morris (Prueba de sonda) con ratones en el modelo de la enfermedad de Alzheimer tratados con anticuerpos anti-gpNMB (GPN06-1 y GPN18-2).

[Figura 13] La Figura 13 muestra la alineación de las secuencias mutantes humanizadas VH1 a VH5 con VH0 de ratón.

[Figura 14] La Figura 14 muestra la alineación de las secuencias mutantes humanizadas VL1 a VL5 con VL0 de ratón.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN

[0053]

La presente invención ahora se describirá en base a formas de realización específicas. No se debe interpretar que estas formas de realización limitan el alcance de la presente invención. Todas las referencias, incluso las publicaciones de patentes, publicaciones de patentes no examinadas, y publicaciones no relacionadas con patentes citadas en esta memoria, se pueden incorporar por referencia en su totalidad para todos los fines.

[0054]

[Anticuerpo anti-gpNMB]

Una forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-gpNMB o su fragmento o un derivado de este, que se une específicamente con al menos un sitio en una región de un dominio similar a PMEL-CAF (similar a un fragmento amiloide central PMEL) con un dominio PKD de la gpNMB humana (proteína B de melanoma no metastásico de glicoproteína) (de aquí en adelante, también denominado “el anticuerpo anti-gpNMB de la presente invención” o “el anticuerpo de la presente invención”). La afirmación “con al menos un sitio en una región de un dominio similar a PMEL-CAF con

un dominio PKD de la gpNMB” se refiere, en el presente documento, con al menos un sitio en una región con, por ejemplo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 172 a 319 en la gpNMB humana con una secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO 209.

[0055]

*Anticuerpo:

El término “anticuerpo” se refiere aquí a una glicoproteína que contiene al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas a través de enlaces disulfuro. Cada cadena pesada contiene una región variable de cadena pesada (abreviada como VH) y una región constante de cadena pesada, y la región constante de cadena pesada contiene tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera contiene una región variable de cadena ligera (abreviada como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera contiene un dominio, CL. La región constante de cadena ligera tiene dos cadenas denominadas cadena λ y cadena κ . La región constante de cadena pesada tiene una cadena γ , una cadena μ , una cadena α , una cadena δ y una cadena ϵ , y tiene isotipos de anticuerpos denominados IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente, que dependen de la diferencia en la cadena pesada. Las regiones VH y VL además se dividen en cuatro regiones (FR-1, FR-2, FR-3, FR-4) que poseen un nivel de preservabilidad más alto denominado regiones de marco (FR) y tres regiones (CDR-1, CDR-2, CDR-3) denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR). La región VH comprende tres CDR y cuatro FR, en detalle, una secuencia de FR-1, CDR-1 (CDR-H1), FR-2, CDR-2 (CDR-H2), FR-3, CDR-3 (CDR-H3) y FR4 desde el terminal amino hasta el terminal carboxi. La región VL comprende tres CDR y cuatro FR, en detalle, una secuencia de FR-1, CDR-1 (CDR-L1), FR-2, CDR-2 (CDR-L2), FR-3, CDR-3 (CDR-L3) y FR4 desde el terminal amino hasta el terminal carboxi. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen dominios de unión que interactúan con un antígeno.

[0056]

El anticuerpo de la presente invención puede ser un fragmento (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) y/o un derivado de un anticuerpo, siempre y cuando presente la actividad de unión específica con al menos un sitio en una región de un dominio similar a PMEL-CAF con un dominio PKD de la gpNMB. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen F (ab')₂, Fab y Fv. Los ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen un anticuerpo en el cual se incorpora artificialmente una mutación de aminoácidos en la región constante, un anticuerpo en el cual se modifica la configuración del dominio de la región constante, un anticuerpo en la forma que posee dos o más fragmentos Fc por molécula, un anticuerpo compuesto por solo una cadena pesada o una cadena ligera, un anticuerpo modificado de cadena de azúcares, un anticuerpo biespecífico, un conjugado del anticuerpo combinado con un anticuerpo o un compuesto del fragmento de un anticuerpo o una proteína que no son anticuerpos, una enzima de anticuerpos, un

nanocuerpo, un fragmento de scFv en tándem, un fragmento de scFv en tándem biespecífico, un diacuerpo, y un cuerpo VHH. En la presente invención, el término "anticuerpo" simplemente incluye un fragmento y/o un derivado de un anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario.

[0057]

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, pero puede ser preferentemente un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere típicamente a una molécula de anticuerpo obtenida de un clon derivado de una célula productora de anticuerpos única, y es un tipo único de molécula de anticuerpo que contiene una combinación de VH y VL, cada una de las cuales consiste en una secuencia de aminoácidos específica. Es posible obtener, a partir de un anticuerpo monoclonal, una molécula de ácido nucleico con una secuencia génica que codifica los aminoácidos de cada una de las proteínas que constituyen el anticuerpo, y también es posible producir el anticuerpo usando tales moléculas de ácido nucleico con métodos de ingeniería genética. Es bien sabido para un experto en la técnica que la información genética de las secuencias de, por ejemplo, las cadenas H y L, sus regiones variables y sus CDR se pueden usar para modificar el anticuerpo con el fin de mejorar su unión y especificidad, etc., y que los anticuerpos de animales, como ratones, se pueden modificar en anticuerpos de tipo humano para producir anticuerpos con una estructura adecuada para su uso como agentes terapéuticos. Un anticuerpo monoclonal humano también se puede producir con un animal transgénico en el cual se ha introducido un gen de anticuerpo humano para ser sensibilizado con un antígeno. Otros métodos que no requieren sensibilización de animales incluyen el uso de bibliotecas de que expresan regiones de unión a antígeno de anticuerpos humanos o porciones de estos (muestra de fagos de anticuerpos humanos) para obtener anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos o clones de fagos correspondientes que consisten en secuencias de aminoácidos específicas, y los expertos en la técnica pueden usar dicha información para producir anticuerpos humanos según corresponda (véase, por ejemplo, la revisión de Taketo Tanaka *et al.*, en *Keio J. Med.*, (2011), 60:37–46). Los expertos en la técnica también pueden diseñar anticuerpos que se administrarán a animales no humanos usando la información de la secuencia de aminoácidos de CDR y regiones variables según corresponda, usando una técnica similar a la técnica de humanización.

[0058]

La especificidad de un anticuerpo aquí significa que el anticuerpo exhibe una reacción antígeno–anticuerpo elevada con respecto a un antígeno específico. Los expertos en la técnica pueden determinar la reacción antígeno–anticuerpo seleccionando adecuadamente un método de selección de unión en un sistema de fase sólida o fase líquida. Los ejemplos de tales métodos incluyen, aunque no a modo de limitación, el

ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el inmunoensayo enzimático (EIA), la resonancia de plasmones superficiales (SPR), la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) y la transferencia de energía por resonancia luminiscente (LRET). Antes de medir la unión entre un antígeno y un anticuerpo, el anticuerpo y/o el antígeno se puede etiquetar con, por ejemplo, una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia luminiscente o un radioisótopo, y luego se puede detectar la reacción antígeno–anticuerpo mediante un método adecuado para las propiedades físicas y/o químicas de la sustancia etiquetada.

[0059]

*Unión específica con al menos un sitio en una región de un dominio similar a PMEL–CAF con un dominio PKD de la gpNMB:

El anticuerpo de la presente invención se une específicamente con al menos un sitio en una región de un dominio similar a PMEL–CAF con un dominio PKD de la gpNMB. El término “gpNMB” (proteína B de melanoma no metastásico de glicoproteína, también denominada Osteoactivina o DC–HIL) se refiere aquí a la glicoproteína transmembranal simple mencionada anteriormente. Para obtener más detalles, véanse cada uno de los documentos mencionados anteriormente (en especial la Literatura 20 no relacionada con patentes).

[0060]

La secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud total de la gpNMG humana (isotipo a) se muestra en la SEQ ID NO 209, y la secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica la proteína se muestra en la SEQ ID NO 210. La secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud total de la gpNMB de ratón se muestra en la SEQ ID NO 211, y la secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica la proteína se muestra en la SEQ ID NO 212. La secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud total de la gpNMB de rata se muestra en la SEQ ID NO 213, y la secuencia de ácido nucleico de un gen que codifica la proteína se muestra en la SEQ ID NO 214. La alineación de las secuencias de aminoácidos de la gpNMG humana (isotipo a) y de la gpNMB de ratón se muestra en la Figura 1.

[0061]

El dominio PKD (homología de la enfermedad renal poliquística) de la gpNMB es un dominio que contiene una lámina beta que consiste en tres cadenas y una lámina beta que consiste en cuatro cadenas plegadas que, en conjunto, forman una estructura beta tipo sándwich. Se denomina dominio PKD porque es una estructura característica dominado por la policistina–1 (policistina–1), el gen responsable de la enfermedad renal poliquística (Literatura 26 no relacionada con patentes). De acuerdo con una forma de realización, en el caso de la gpNMG humana definida en la SEQ ID NO 209 y de la gpNMB de ratón

definida en la SEQ ID NO 211, la región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 256 a 319 corresponde al dominio PKD. De acuerdo con una forma de realización, el dominio PKD puede ser preferentemente una región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 256 a 316, más preferentemente una región que contiene las posiciones 257 a 316, aún más preferentemente una región que contiene las posiciones 268 a 316, incluso más preferentemente una región que contiene las posiciones 270 a 316, en particular preferentemente una región que contiene las posiciones 282 a 316, en especial preferentemente una región que contiene las posiciones 287 a 316. De acuerdo con una forma de realización, el dominio PKD puede ser preferentemente una región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 257 a 319, más preferentemente una región que contiene las posiciones 257 a 316, aún más preferentemente una región que contiene las posiciones 257 a 301. De acuerdo con una forma de realización, el dominio PKD puede ser preferentemente una región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 287 a 301. La región de los residuos de aminoácidos en las posiciones 256 a 319 rodeadas por una línea continua en la Figura 1 es un ejemplo del dominio PDK de cada gpNMB humana y gpNMB de ratón.

[0062]

El dominio similar a PMEL–CAF (similar a un fragmento amiloide central PMEL) de la gpNMB es una región que es homóloga a una región CAF en la proteína PMEL de una proteína de la misma familia, tal como se describió anteriormente, que es una región que induce la formación de agregados tipo amiloides en una proteína PMEL. Se considera el dominio similar a PMEL–CAF de la gpNMB para prevenir la formación de agregados, mediante numerosos sitios de unión glicanos tipo N en la región PKD circundante (Literatura 67 no relacionada con patentes). De acuerdo con una forma de realización, en el caso de la gpNMG humana definida en la SEQ ID NO 209 y de la gpNMB de ratón definida en la SEQ ID NO 211, la región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 172 a 246 corresponde al dominio similar a PMEL–CAF. El dominio similar a PMEL–CAF puede ser preferentemente una región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 178 a 228, más preferentemente una región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 186 a 218. La región de los residuos de aminoácidos en las posiciones 172 a 246 rodeadas por una línea continua en la Figura 1 es un ejemplo del dominio similar a PMEL–CAF de cada gpNMB humana y cada gpNMB de ratón.

[0063]

El término “región comprendida entre un dominio similar a PMEL–CAF y un dominio PKD de la gpNMB” se refiere, en este documento, a una región que contiene no solo el dominio similar a PMEL–CAF y el dominio PKD definido anteriormente, sino también a una región que interviene entre el dominio similar a PMEL–CAF y el dominio

PKD. De acuerdo con una forma de realización, en el caso de la gpNMG humana definida en la SEQ ID NO 209 y de la gpNMB de ratón definida en la SEQ ID NO 211, la región que contiene los residuos de aminoácidos en las posiciones 172 a 319 corresponde a una región comprendida entre un dominio similar a PMEL-CAF y un dominio PKD.

[0064]

El anticuerpo de la presente invención puede tener la capacidad de unirse específicamente con al menos un sitio en una región comprendida entre un dominio similar a PMEL-CAF y un dominio PKD de la gpNMB de cualquier vertebrado. Sin embargo, en vista de los usos farmacéuticos, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente la capacidad de unirse específicamente con al menos un sitio en una región comprendida entre un dominio similar a PMEL-CAF y un dominio PKD de al menos la gpNMB humana definida en la SEQ ID NO 209. Desde el punto de vista de la evaluación del efecto en la gpNMB endógena en ratones del modelo de la enfermedad y ratas del modelo de la enfermedad, el anticuerpo de la presente invención puede tener, más preferentemente, la capacidad de unirse específicamente con al menos un sitio en una región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD de la gpNMB de ratón definida en la SEQ ID NO 211, además de al menos un sitio en una región comprendida entre un dominio similar a PMEL-CAF y un dominio PKD de la gpNMG humana. La afirmación de que un anticuerpo se une “específicamente” a una gpNMB, incluida en el presente documento, se refiere a la capacidad de unión del anticuerpo al gpNMB con una fuerza de unión de 10 veces o más, preferentemente 100 veces o más, más preferentemente 1000 veces o más, en comparación con la capacidad de unión del anticuerpo con las proteínas diferentes de la gpNMB (por ejemplo, albúmina). Además, la “región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD” se refiere aquí a una región que incluye el dominio similar a PMEL-CAF, el dominio PKD y la región que interviene entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD.

[0065]

Cuando el anticuerpo de la presente invención se une específicamente con al menos un sitio de una región comprendida entre un dominio similar a PMEL-CAF y un dominio PKD de la gpNMG humana, el epítipo en la región a la cual se une el anticuerpo no es particularmente limitado. Sin embargo, el anticuerpo de la presente invención puede tener, preferentemente, la capacidad de unirse específicamente con al menos un sitio o más en una región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD, y puede, más preferentemente, tener la capacidad de unirse específicamente a uno o más sitios seleccionados a partir de un sitio que contiene residuos de aminoácidos K257 y/o D258 del dominio PKD, un sitio que contiene residuos de aminoácidos H268 y/o D269 del dominio PKD, un sitio que contiene un residuos de aminoácidos K282 del dominio PKD,

un sitio que contiene residuos de aminoácidos D287 y/o H301 del dominio PKD, un sitio que contiene un residuo de aminoácidos K316 del dominio PKD, un sitio que contiene un residuo de aminoácidos K186 del dominio similar a PMEL-CAF, un sitio que contiene residuos de aminoácidos R214 y/o R215 del dominio similar a PMEL-CAF, y un sitio que contiene residuos de aminoácidos H216 y/o R218 del dominio similar a PMEL-CAF de la gpNMB humana definida en la SEQ ID NO 209. Entre ellos, el anticuerpo de la presente invención puede tener, preferentemente, la capacidad de unirse específicamente con al menos uno o ambos sitios que contienen residuos de aminoácidos D287 y/o H301 del dominio PKD y un sitio que contiene residuos de aminoácidos R214 y/o R215 del dominio similar a PMEL-CAF de la gpNMB humana definida en la SEQ ID NO 209 y, además de estos sitios, puede tener, preferentemente, la capacidad de unirse específicamente también a uno o más sitios seleccionados a partir de un sitio que contiene residuos de aminoácidos K257 y/o D258, un sitio que contiene residuos de aminoácidos H268 y/o D269, un sitio que contiene un residuo de aminoácidos K282, un sitio que contiene residuos de aminoácidos K316, K186, una región que contiene un residuo de aminoácidos, y un sitio que contiene residuos de aminoácidos H216 y/o R218 de la gpNMB humana.

[0066]

La fuerza de unión del anticuerpo de la presente invención con la región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD de la gpNMB no está particularmente limitada. Sin embargo, según la medición realizada con la prueba ELISA de antígenos usando gpNMB recombinantes y/o la prueba ELISA de células usando células que expresan gpNMB, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente una concentración efectiva del 50% (EC_{50}) para la región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD de la gpNMB, que normalmente es $1 \times 10^{-7}M$ o menos, o $1 \times 10^{-8}M$ o menos, o $1 \times 10^{-9}M$ o menos. La “concentración efectiva del 50%” (EC_{50}) de un anticuerpo se refiere aquí a la concentración del anticuerpo que exhibe el 50% de la afinidad de unión máxima con la que el anticuerpo se une al antígeno. Las condiciones específicas para medir la EC_{50} mediante la prueba ELISA de antígenos usando gpNMB recombinantes y/o la prueba ELISA de células usando células que expresan gpNMB incluyen las empleadas en los ejemplos descritos a continuación.

[0067]

El anticuerpo de la presente invención también puede unirse a uno o más sitios en cualquier región que no sea la región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD de la gpNMB. Los ejemplos de sitios de aminoácidos a los cuales se puede unir el anticuerpo de la presente invención, que no sea la región comprendida entre el dominio similar a PMEL-CAF y el dominio PKD de la gpNMB puede incluir preferentemente, aunque no a modo de limitación, E385 de la gpNMB humana definida en la SEQ ID NO 209.

[0068]

*Actividades del anticuerpo:

De acuerdo con una forma de realización, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente varias actividades que se explican a continuación.

[0069]

El anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente la actividad para unirse a microglías. Se informó que la gpNMB se expresa en microglías disfuncionales que se tornaron deficientes en cuanto a su capacidad de degradar proteínas tóxicas o indeseadas bajo condiciones de estrés (Literatura 43 no relacionada con patentes). El anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente la actividad para unirse con al menos un sitio en una región comprendida entre el dominio similar a PMEL–CAF y el dominio PKD de la gpNMB expresada en la membrana plasmática de las microglías deficientes mencionadas.

[0070]

El anticuerpo de la presente invención también puede tener preferentemente varias actividades contra las microglías. Específicamente, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente al menos uno o más de:

- (a) la actividad para reducir o eliminar microglías deficientes;
- (b) la actividad para promover las funciones normales de las microglías para fagocitar microglías deficientes o la actividad para normalizar la deficiencia de las microglías deficientes; y
- (c) la actividad para mejorar el efecto de las microglías normales en las proximidades de las microglías deficientes.

[0071]

Se desconoce la relación entre las actividades anteriormente mencionadas del anticuerpo de la presente invención, es decir, (a) la actividad para reducir o eliminar las microglías deficientes, (b) la actividad para promover las funciones normales de las microglías para fagocitar microglías deficientes o la actividad para normalizar la deficiencia de las microglías deficientes, y (c) la actividad para mejorar los efectos de las microglías normales en las proximidades de las microglías deficientes. Sin embargo, aunque no necesariamente se ciñe a la teoría, la relación se infiere como se explica a continuación. Específicamente, se asume que la unión del anticuerpo de anti–gpNMB con las microglías deficientes puede hacer que se las reconozca a través de las microglías normales con la actividad fagocítica, que fagocita y elimina las microglías deficientes para crear un espacio en el que las microglías normales proliferan para promover la normalización del entorno cerebral, con lo cual inducen la eliminación de las proteínas

tóxicas de las neuronas y el restablecimiento del número de sinapsis. Alternativamente, se asume que el anticuerpo anti-gpNMB puede promover la activación fagocítica o la proliferación de microglías y mejorar la fagocitosis de las microglías deficientes para promover la normalización del entorno cerebral, con lo cual inducen la eliminación de las proteínas tóxicas de las neuronas y el restablecimiento del número de sinapsis.

[0072]

El anticuerpo de la presente invención también puede tener preferentemente la actividad para mejorar o restablecer el entorno cerebral o las funciones neuronales. Específicamente, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente al menos una o ambas de las siguientes:

- x) la actividad para eliminar oligómeros beta amiloides; y
- y) la actividad para aumentar el número de sinapsis.

[0073]

El anticuerpo de la presente invención también puede tener preferentemente z) la actividad para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas. Específicamente, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente la actividad para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas. Específicamente, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente la actividad para tratar o prevenir las enfermedades neurodegenerativas que se explican a continuación.

[0074]

Las enfermedades clasificadas como enfermedades neurodegenerativas se pueden dividir en tauopatías y otras enfermedades neurodegenerativas. Los ejemplos específicos de cada categoría se proporcionan a continuación.

[0075]

Los ejemplos específicos de tauopatías (enfermedades en las que se acumula la proteína tau y ocasiona neurodegeneración) incluyen la enfermedad de Alzheimer, la degeneración lobar frontotemporal (FTLD-Tau), la demencia frontotemporal (FTD), la tauopatía primaria relacionada con la edad (PART), la encefalopatía traumática crónica (CTE), la enfermedad de Pick, la degeneración de los ganglios basales de la corteza cerebral (CBD o CBS), la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la tauopatía globular glial (GGT), la demencia de argirofilia granulosa (AGD) (enfermedad argirofílica granulosa), la astrogliopatía tau relacionada con el envejecimiento (ARTAG), la demencia familiar tipo británica (FBD), la demencia familiar tipo danesa (FDD), FTDP17, la tauopatía multisistémica con demencia (MSTD), la demencia de ovillo neurofibrilar, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), y la tauopatía de materia blanca con inclusiones globulares gliales (WMT-GGI).

[0076]

Los ejemplos específicos de enfermedades neurodegenerativas distintas de la tauopatía incluyen la enfermedad de Parkinson (acumulación de α Syn), la enfermedad de Huntington (acumulación de huntingtin mutante), la degeneración espinocerebelosa (acumulación de la proteína de ácido poliglutámico), la ataxia espinocerebelosa hereditaria (acumulación de la proteína de ácido poliglutámico), la atrofia muscular espinobulbar (acumulación de la proteína de ácido poliglutámico), la demencia de cuerpos de Lewy (acumulación de α Syn), la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (acumulación de proteínas priónicas anormales), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (acumulación de SOD o TDP43) y degeneración lobar frontotemporal (acumulación de FTLD–TDP, FTLD–FUS:TDP43 o FUS).

[0077]

En los ejemplos descritos a continuación, los presentes inventores analizaron los efectos de los anticuerpos de la presente invención administrando anticuerpos según una forma de realización de la presente invención a ratones seniles del modelo de la enfermedad de Alzheimer (AD) y evaluando secciones de sus cerebros mediante inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que la administración de sus anticuerpos disminuyó las microglías gpNMB positivas en los cerebros de los ratones del modelo AD. Más sorprendente aún es que se descubrió que los oligómeros A β , la forma más tóxica de la proteína β amiloide en los cerebros de los ratones del modelo AD, se eliminaron de las neuronas. Más sorprendente aún es que se descubrió que la administración de los anticuerpos restableció el número de sinapsis neuronales en los cerebros de los ratones del modelo AD a niveles normales. Más sorprendente aún es que se descubrió que la administración de los anticuerpos restableció la función cognitiva, según la prueba del laberinto acuático de Morris, usando el modelo APP/Tau–Tg (ratones del modelo AD) recientemente desarrollado por los presentes inventores.

[0078]

El anticuerpo de la presente invención puede ejercer las diversas actividades anteriormente mencionadas *in vivo* o *ex vivo*, o con ambos procedimientos a la vez. Ya sea *in vivo* o *ex vivo*, los sujetos en los que se exhiben las diversas actividades no están limitados, pero el anticuerpo de la presente invención puede ejercer preferentemente las diversas actividades al menos en vertebrados, más preferentemente al menos en mamíferos, en especial en humanos o animales no humanos.

[0079]

*Secuencia de aminoácidos y secuencia de ácido nucleico de cada región y de cada cadena del anticuerpo:

La secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención no es particularmente limitada, siempre que tenga la capacidad de unirse específicamente con al menos un sitio en una región comprendida entre un dominio similar a PMEL–CAF y un dominio PKD de la gpNMB. Sin embargo, el anticuerpo de la presente invención puede tener preferentemente una secuencia de aminoácidos específica, como cada secuencia de CDR. Los detalles se explicarán a continuación. Por otra parte, la “identidad” de las secuencias de aminoácidos aquí descritas se refiere a la proporción de residuos de aminoácidos compatibles, y la “homología” de las secuencias de aminoácidos aquí descritas se refiere a la proporción de residuos de aminoácidos compatibles o similares. La homología y la identidad de las secuencias de aminoácidos se puede determinar, por ejemplo, mediante el método BLAST (condiciones predeterminadas de PBLAST del NCBI). También está claro que cuando se usa la frase “una homología de 80% o más”, por ejemplo, esta incluye “una identidad del 80% o más”.

[0080]

El término “residuos de aminoácidos similares” se refiere aquí a los residuos de aminoácidos que presentan cadenas laterales con características químicas similares (por ejemplo, carga de hidrofobicidad). Los residuos de aminoácidos similares incluyen, por ejemplo, las siguientes combinaciones.

- 1) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas: residuo de glicina (Gly o G), alanina (Ala o A), valina (Val o V), leucina (Leu o L) e isoleucina (Ile o I).
- 2) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales de hidroxilo alifático: residuos de serina (Ser o S) y treonina (Thr o T).
- 3) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales que contienen amidas: residuos de asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q).
- 4) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas: residuos de fenilalanina (Phe o F), tirosina (Tyr o Y) y triptófano (Trp o W).
- 5) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales básicas: residuo de lisina (Lys o K), arginina (Arg o R) e histidina (His o H).
- 6) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales ácidas: residuo de ácido aspártico (Asp o D) y ácido glutámico (Glu o E).
- 7) Residuos de aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre: residuo de cisteína (Cys o C) y metionina (Met o M).

Además, la combinación de 1) y metionina (Met o M) y la combinación de 4) e histidina (His o H) también se tratan como residuos de aminoácidos similares.

[0081]

En algunos casos, se pueden hacer sustituciones independientemente de la similitud si existen las variantes correspondientes con referencia a la secuencia germinal. Las variantes con referencia germinal incluyen sustituciones, deleciones o adiciones. Las sustituciones incluyen casos en los que se presume que los residuos de aminoácidos, después de la sustitución, afectan la dirección de la cadena lateral, como prolina (Pro o P) y glicina (Gly o G).

[0082]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a anticuerpos que contienen una región variable de cadena pesada con cualquiera de las combinaciones de las secuencias CDR-H1 a -H3 especificadas en 1) a 12) a continuación.

[0083]

(1) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 1, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 1 por sustitución, deleción o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 1, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 3, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 3 por sustitución, deleción o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 3, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 5, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 5 por sustitución, deleción o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 75,0% o más 83,3% o más, o 91,6% o más con SEQ ID NO 5.

[0084]

(2) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 17, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 17 por sustitución, deleción o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 17, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 19, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 19 por sustitución, deleción o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 19, y

como secuencia CDR–H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 21, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 21 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 21.

[0085]

(3) Como secuencia CDR–H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 33, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 33 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 33,

como secuencia CDR–H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 35, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 35 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 35, y

como secuencia CDR–H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 37, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 37 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 37.

[0086]

(4) Como secuencia CDR–H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 49, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 49 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 49,

como secuencia CDR–H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 51, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 51 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 51, y

como secuencia CDR–H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 53, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 53 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o

más, 68.7% o más, 75,0% o más 81,2% o más, 87,5% o más, o 93,7% o más con SEQ ID NO 53.

[0087]

(5) Como secuencia CDR–H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 65, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 65 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 65,

como secuencia CDR–H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 67, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 67 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 67, y

como secuencia CDR–H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 69, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 69 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 78,5% o más, 85,7% o más, o 92,8% o más con SEQ ID NO 69.

[0088]

(6) Como secuencia CDR–H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 81, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 81 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 81,

como secuencia CDR–H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 83, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 83 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 83, y

como secuencia CDR–H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 85, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 85 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 85.

[0089]

(7) Como secuencia CDR–H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 97, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 97 por sustitución, delección o

inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 97, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 99, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 99 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 99, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 101, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 101 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 101.

[0090]

(8) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 113, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 113 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 113, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 115, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 115 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 115, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 117, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 117 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 117.

[0091]

(9) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 129, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 129 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 129, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 131, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 131 por sustitución, delección o

inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 131, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 133, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 133 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 133.

[0092]

(10) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 145, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 145 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 145, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 147, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 147 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más, u 87,5% o más con SEQ ID NO 147, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 149, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 149 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 149.

[0093]

(11) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 161, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 161 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 161, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 163, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 163 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 163, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 165, o una

secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 165 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 66,6% o más, 73,3% o más, 80,0% o más, 86,6% o más, o 93,3% o más con SEQ ID NO 165.

[0094]

(12) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 287, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 287 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 62,5% o más, 75,0% o más 87,5% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 287, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 289, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 289 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 71,4% o más, u 85,7% o más con SEQ ID NO 289, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 291, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 291 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 291.

[0095]

Como se muestra en el Ejemplo 17 a continuación, los presentes inventores investigaron la importancia de cada residuo de aminoácido de cada CDR de anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (clon GPN06-1) para mantener su capacidad de unión por escaneo de alanina. Los resultados mostraron que en la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 29), los siguientes residuos de aminoácidos se identificaron como importantes para mantener la unión: en CDR-H1 (SEQ ID NO 17), asparagina en la posición 32 y triptófano en la posición 33; en CDR-H2 (SEQ ID NO 19), ácido aspártico en la posición 55, fenilalanina en la posición 57, y treonina en la posición 58; y en CDR-H3 (SEQ ID NO 21), arginina en la posición 98, glicina en la posición 100, y glicina en la posición 109. Por otro lado, los residuos de aminoácidos de cada CDR distintos de aquellos enumerados antes se identificaron como con poco efecto en el mantenimiento de la capacidad de unión del anticuerpo. Sobre la base de estos hallazgos, una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se relaciona con un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada con las secuencias CDR-H1 a -H3 especificadas en (13) a continuación (las posiciones de aminoácidos especificadas a continuación se indican con respecto a la secuencia de

aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 29)).

(13) Como secuencia CDR-H1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 17, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 17 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos de aminoácidos distintos de asparagina en la posición 32 y triptófano en la posición 33, como secuencia CDR-H2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 19, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 19 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos distintos de ácido aspártico en la posición 55, fenilalanina en la posición 57, y treonina en la posición 58, y como secuencia CDR-H3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 21, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 21 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce residuos de aminoácidos distintos de arginina en la posición 98, glicina en la posición 100, y glicina en la posición 109.

[0096]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que contiene una región variable de cadena liviana que tiene cualquier combinación de las secuencias CDR-L1 a - L3 especificadas en (1) a (12) a continuación.

[0097]

(1) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 7, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 7 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 7, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 9, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 9 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 9, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 11, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 11 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 11.

[0098]

(2) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 23, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 23 por sustitución, delección o inserción

de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 23,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 25, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 25 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 25, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 27, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 27 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 27.

[0099]

(3) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 39, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 39 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 39,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 41, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 41 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 41, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 43, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 43 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 43.

[0100]

(4) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 55, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 55 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 55,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 57, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 57 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 57, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 59, o una secuencia

de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 59 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 59.

[0101]

(5) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 71, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 71 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, u 80,0% o más con SEQ ID NO 71,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 73, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 73 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 73, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 75, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 75 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 75.

[0102]

(6) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 87, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 87 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 87,

como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 89, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 89 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 89, y

como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 91, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 91 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 91.

[0103]

(7) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 103, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 103 por sustitución, delección o

inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, u 83,3% o más con SEQ ID NO 103, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 105, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 105 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 105, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 107, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 107 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 107.

[0104]

(8) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 119, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 119 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 119, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 121, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 121 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 121, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 123, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 123 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 123.

[0105]

(9) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 135, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 135 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 135, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 137, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 137 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 137, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 139, o una secuencia

de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 139 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 139.

[0106]

(10) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 151, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 151 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 60,0% o más, 70,0% o más, 80,0% o más, o 90,0% o más con SEQ ID NO 151, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 153, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 153 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 153, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 155, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 155 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 155.

[0107]

(11) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 167, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 167 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más, o 90,9% o más con SEQ ID NO 167, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 169, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 169 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 169, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 171, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 171 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 171.

[0108]

(12) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 293, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 293 por sustitución, delección o

inserción de cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 64,2% o más, 71,4% o más, 81,8% o más o 90,9% o más con SEQ ID NO 293, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 295, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 295 por sustitución, delección o inserción de cualquier un residuo de aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más con SEQ ID NO 295, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 297, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 297 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos, o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de 66,6% o más, 77,7% o más, u 88,8% o más con SEQ ID NO 297.

[0109]

Como se muestra en el Ejemplo 17 a continuación, los presentes inventores investigaron la importancia de cada residuo de aminoácido de cada CDR del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (clon GPN06-1) para mantener su capacidad de unión por escaneo de alanina. Los resultados mostraron que en la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 31), los siguientes residuos de aminoácidos se identificaron como importantes para mantener la unión: en CDR-L1 (SEQ ID NO 23), isoleucina en la posición 29 y tirosina en la posición 31; en CDR-L2 (SEQ ID NO 25), treonina en la posición 50; y en CDR-L3 (SEQ ID NO 27), histidina en la posición 88, glutamina en la posición 89, triptófano en la posición 90, serina en la posición 92, y tirosina en la posición 93. Por otro lado, los residuos de aminoácidos de cada CDR distintos de aquellos enumerados antes se identificaron como con poco efecto en el mantenimiento de la capacidad de unión del anticuerpo. Sobre la base de estos hallazgos, una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que contiene una región variable de cadena liviana con las secuencias CDR-L1 a -L3 especificadas en (13) a continuación (las posiciones de aminoácidos especificadas a continuación se indican con respecto a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 31)).

(13) Como CDR-L1, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 23, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 23 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno, dos o tres residuos de aminoácidos distintos de isoleucina en la posición 29 y tirosina en la posición 31, como CDR-L2, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 25, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 25 por sustitución, delección o inserción de cualesquiera uno o dos residuos de aminoácidos distintos de treonina en el Nro. 50, y como CDR-L3, la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 27, o una secuencia de aminoácidos derivada de SEQ ID NO 27 por sustitución, delección o inserción de

cualesquiera uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos distintos de histidina en la posición 88, glutamina en la posición 89, triptófano en la posición 90, serina en la posición 92, y tirosina en la posición 93.

[0110]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene una región variable de cadena pesada que tiene cualquiera de las combinaciones de las secuencias CDR–H1 a H3 descritas antes y una región variable de cadena liviana que tiene cualquiera de las combinaciones de las secuencias CDR–L1 a L3 descritas antes.

[0111]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos (a) a (c) como la secuencia de la región variable de cadena pesada.

[0112]

(a) Una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 29, SEQ ID NO 45, SEQ ID NO 61, SEQ ID NO 77, SEQ ID NO 93, SEQ ID NO 109, SEQ ID NO 125, SEQ ID NO 141, SEQ ID NO 157, SEQ ID NO 173, y SEQ ID NO 299.

[0113]

(b) Una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de al menos 60% o más, o 65% o más, o 70% o más, o 75% o más, u 80% o más, u 85% o más, o 90% o más, o 95% o más, o 96% o más, o 97% o más, o 98% o más, o 99% o más con cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) más arriba.

[0114]

(c) Una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) más arriba por sustitución, deleción o adición de 1 a 12 (preferiblemente 1 a 11, más preferiblemente 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1) residuos de aminoácidos.

[0115]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos (a) a (c) como la secuencia de la región variable de cadena liviana.

[0116]

(a) Una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 63, SEQ ID NO 79, SEQ ID NO 95, SEQ ID NO 111, SEQ ID NO 127, SEQ ID NO 143, SEQ ID NO 159, SEQ ID NO 175 y SEQ ID NO 301.

[0117]

(b) Una secuencia de aminoácidos que tiene una homología (preferiblemente identidad) de al menos 60% o más, o 65% o más, o 70% o más, o 75% o más, u 80% o más, u 85% o más, o 90% o más, o 95% o más, o 96% o más, o 97% o más, o 98% o más, o 99% o más con cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) más arriba.

[0118]

(c) Una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificadas en (a) más arriba por sustitución, deleción o adición de 1 a 12 (preferiblemente 1 a 11, más preferiblemente 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1) residuos de aminoácidos.

[0119]

Una forma de realización del anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada descritas antes y cualquiera de las secuencias de región variable de cadena liviana descritas antes.

[0120]

Las secuencias CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, y CDR-L3 del anticuerpo pueden identificarse mediante el método de Kabat (NIH Publication, (1991) No. 91-3242) o el método de Chothia (J. Mol. Biol., (1997), 273). Estos métodos están dentro del conocimiento técnico común del experto en el arte, y también se describen, por ejemplo, en la página de inicio de Internet del Grupo del Dr. Andrew C.R. Martin (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Las CDR descritas aquí se indican como CDR de Kabat.

[0121]

Las secuencias de marco de cada una de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena liviana de la inmunoglobulina como el anticuerpo de la presente invención pueden ser preferiblemente secuencias de marco de cada clase de inmunoglobulinas de vertebrados y, más preferiblemente, secuencias de marco de cada clase de inmunoglobulinas de humanos o animales no humanos, como ratones o ratas.

[0122]

El experto en el arte podría diseñar el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención combinando la secuencia de aminoácido de cada una de las CDR y/o cada una de las regiones variables de cadena pesada y liviana descritas antes con la secuencia de aminoácidos de cada una de las regiones de marco y/o cada una de las regiones constantes de cadena pesada y liviana de un anticuerpo derivado de animales humanos o no humanos, incluidos ratones o ratas, según corresponda. En tal sentido, un anticuerpo específico anti-gpNMB humanizado se puede diseñar usando la secuencia de aminoácidos de cada una de las regiones de marco y/o cada una de las regiones constantes de cadena pesada y liviana de un anticuerpo humano. La secuencia de aminoácidos de cada una de las regiones de marco y/o cada una de las regiones constantes de cadena pesada y liviana de dicho anticuerpo humanizado se puede seleccionar, por ejemplo, de cada clase de IgG, IgA, IgM, IgE e IgD humanas, y sus variantes.

[0123]

El anticuerpo de la presente invención puede ser preferiblemente un anticuerpo de clase IgG o su variante, más preferiblemente de la clase IgG humana o su variante, de la subclase IgG4 humana o su variante, o la subclase IgG1 humana o su variante. En un ejemplo, la región constante de IgG4 estabilizada contiene una prolina en la posición 241 de la región bisagra, según el sistema de Kabat. Esta posición corresponde a la posición 228 de la región bisagra según el esquema de numeración de EU (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1969), 63[1]:78–85), Sequences of proteins of immunological interest (Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 and NIH Publication, (1991), No. 91–3242). Este residuo generalmente es serina en la IgG4 humana, pero su estabilización puede inducirse sustituyendo la serina con prolina. En un ejemplo, la mutación N297A se puede incorporar en la región constante de IgG1 para suprimir su capacidad de unión al receptor Fc y/o anclar el complemento en el mayor grado posible.

[0124]

*Unión competitiva:

Una forma de realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a al menos un sitio en una región de un dominio tipo PMEL–CAF con un dominio PKD de gpNMB competitivamente con la unión del anticuerpo de la presente invención al mismo sitio. Dicho anticuerpo de unión competitiva también se incluye dentro del alcance de la presente invención. El término “unión competitiva” aquí se refiere a un fenómeno en el cual cuando coexisten al menos dos anticuerpos monoclonales con un antígeno, la unión de un anticuerpo al antígeno es inhibida por la unión del otro anticuerpo al antígeno. La capacidad de unión competitiva entre dos anticuerpos monoclonales generalmente se puede medir usando una cantidad fija (concentración) de un primer anticuerpo monoclonal, agregando distintas cantidades (concentraciones) de un segundo anticuerpo monoclonal y midiendo la cantidad (concentración) del segundo anticuerpo monoclonal agregado que

disminuye la unión de la cantidad fija del primer anticuerpo monoclonal al antígeno. El grado de inhibición puede expresarse en términos de IC_{50} o Ki. Un anticuerpo monoclonal que se une competitivamente al anticuerpo de la presente invención puede referirse, por ejemplo, a un anticuerpo cuya IC_{50} es usualmente 1000 nM o menor, en particular 100 nM o menor, más particularmente 10 nM o menor. La capacidad de unión competitiva se puede medir, por ejemplo, etiquetando el anticuerpo con una enzima, sustancia fluorescente, sustancia luminiscente, radioisótopo, etc., y realizando la detección mediante un método de medición adecuado para las propiedades físicas y/o químicas de la sustancia etiquetada, o usando un biosensor basado en, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR) e interferometría de biocapa (BLI).

[0125]

[Método de producción del anticuerpo anti-gpNMB]

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede obtener usando técnicas conocidas por el experto en el arte. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal (Nature, (1983), 305(5934): 537–40). Un anticuerpo policlonal de acuerdo con la presente invención puede producirse, por ejemplo, preparando una proteína gpNMB humana que tiene la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 209 o un péptido parcial de gpNMB que tiene una parte de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, un péptido que contiene un dominio PKD con los residuos de aminoácidos 256 a 319) como antígeno, o preparando un polinucleótido que expresa el antígeno que codifica la secuencia de aminoácidos de dicha proteína gpNMB humana o péptido parcial de gpNMB, administrando el antígeno o polinucleótido que expresa el antígeno a un mamífero por vía intramuscular o subcutánea para expresar el antígeno en el cuerpo del animal y así sensibilizar al animal, y recuperando el anticuerpo producido en el cuerpo del animal a partir de, por ejemplo, suero del animal. Cuando se usa un péptido como antígeno, se puede unir a una proteína portadora como BSA o KLH o una polilisina.

[0126]

Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención se puede producir, por ejemplo, administrando la proteína gpNMB humana o el péptido parcial de gpNMB o el polinucleótido que expresa el antígeno que codifica la proteína gpNMB humana o el péptido parcial de gpNMB mencionado antes a un mamífero para así sensibilizar al animal, recolectando células inmunes del mamífero y fusionándolas con células de mieloma para producir hibridomas, clonando cada hibridoma, y recuperando el anticuerpo producido por un cultivo del hibridoma clonado. Dichos métodos para obtener anticuerpos monoclonales (Nature, (1992), 356[6365]:152–4) y técnicas de fusión celular (Nature, (1975), 256[5517]:495–7) ya se han reportado y generalizado, y la administración de inmunoestimulantes puede potenciar aún más la eficiencia de adquisición (Cancer Gene

Ther., (2007), 14[11]:904–17). Los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante este método incluyen, aunque sin limitaciones, lo siguiente.

[0127]

*Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 13 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 15 (GPN05–1).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 29 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 31 (GPN06–1).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 45 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 47 (GPN07–1).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 61 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 63 (GPN11–10).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 77 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 79 (GPN15–2).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 93 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 95 (GPN15–3).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 109 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 111 (GPN18–4).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 125 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 127 (GPN18–1).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 141 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 143 (GPN18–2).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 157 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 159 (GPN18–6).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 173 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 175 (GPN18–7).

* Un anticuerpo que contiene una región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 299 y una región variable de cadena liviana la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO 301 (GPN09–1).

[0128]

Otro método de producción incluye producir un gen que codifica la cadena pesada y/o la cadena liviana del anticuerpo, o más específicamente, una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la cadena liviana de inmunoglobulina del anticuerpo, a partir de un hibridoma que produce el anticuerpo a obtener, o de un clon de fago obtenido mediante presentación en fago de anticuerpo humano. Aquí, la molécula de ácido nucleico puede introducirse en diversos vectores o plásmidos para crear un vector o plásmido que contenga la molécula de ácido nucleico. A continuación, las células huésped se transforman con la molécula de ácido nucleico, el vector o el plásmido descrito anteriormente. Las células huésped pueden seleccionarse de células eucariotas, tales como células de mamífero, insecto, levadura o planta, o de células bacterianas. Las células huésped transformadas luego se cultivan en condiciones apropiadas para producir el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención. Si es necesario, el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención producido puede aislarse de las células huésped. Los diversos métodos utilizados en estos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia.

[0129]

Un experto en la materia también puede producir proteínas quiméricas de anticuerpos, anticuerpos de molécula pequeña, anticuerpos con andamiaje, etc., utilizando técnicas conocidas, mediante la modificación genética de genes que codifican cadenas pesadas y/o livianas de inmunoglobulinas para introducir rasgos deseados, o utilizando información estructural de regiones variables o regiones CDR de cadenas pesadas y/o livianas de inmunoglobulinas. El experto en la materia también puede realizar modificaciones en la estructura de las regiones constantes o en los sitios de glicosilación del anticuerpo utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia para mejorar el rendimiento del anticuerpo o evitar cualquier efecto secundario.

[0130]

[Composición farmacéutica]

El anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención se puede usar preferentemente como un ingrediente activo de una composición farmacéutica. Por consiguiente, una forma de realización de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención como un ingrediente activo (de aquí en adelante, también denominado colectivamente “la primera composición farmacéutica de la presente invención”).

[0131]

Tal como se mencionó anteriormente, se puede esperar que el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención exprese una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) y (w) a (z) detallados a continuación cuando se administra a un sujeto, como un humano. Por lo tanto, la primera composición farmacéutica de la presente invención puede ser preferentemente una composición farmacéutica que tiene por fin una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) y (w) a (z) detallados a continuación.

- (a) La actividad para reducir o eliminar las microglías deficientes.
- (b) La actividad para promover las funciones de las microglías normales a fin de fagocitar las microglías deficientes o la actividad para normalizar la deficiencia de las microglías deficientes.
- (c) La actividad para mejorar el efecto de las microglías normales en las proximidades de las microglías deficientes.
- (w) La actividad para recuperar las funciones cognitivas.
- (x) La actividad para eliminar los oligómeros β amiloides.
- (y) La actividad para aumentar el número de sinapsis.
- (z) La actividad para tratar o prevenir las enfermedades neurodegenerativas.

[0132]

Como se mencionó anteriormente, se estima que una forma de realización del anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención exhibe una o más de las actividades especificadas en los ítems (w) a (z) detallados anteriormente, como resultado de la exhibición de una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente. Por lo tanto, cuando el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención es un anticuerpo que expresa una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente, la primera composición farmacéutica de la presente invención puede ser preferentemente una composición farmacéutica que tiene por fin una o más de las actividades especificadas en los ítems (w) a (z) detallados anteriormente. Entre las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente, se prefiere la actividad especificada en el ítem (a) detallado anteriormente.

[0133]

Con base en los resultados de los ejemplos aquí descritos, es muy probable que una o más de las actividades especificadas en los ítems (w) a (z) detallados anteriormente se exhiban como resultado de una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente. Este es un nuevo hallazgo de los presentes inventores. Con base en este hallazgo, también es posible preparar una composición farmacéutica que exhiba una o más de las actividades especificadas en los ítems (w) a (z) detallados anteriormente sin utilizar el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención, pero utilizando cualquier otro agente que tenga una o más de las actividades

especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente (por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña o un fármaco macromolecular como un anticuerpo). Por consiguiente, una forma de realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que tiene por fin una o más de las actividades especificadas en los ítems (w) a (z) detallados anteriormente, que contiene un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente (que puede ser, por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña o un fármaco macromolecular como un anticuerpo) como ingrediente activo (de aquí en adelante, también denominado colectivamente “la segunda composición farmacéutica de la presente invención”). Entre las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente, se prefiere la actividad especificada en el ítem (a) detallado anteriormente.

[0134]

Los detalles de la primera composición farmacéutica de la presente invención y de la segunda composición farmacéutica de la presente invención (de aquí en adelante, también denominado colectivamente “la composición farmacéutica de la presente invención”) son, sin limitación, los siguientes.

[0135]

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular como una composición farmacéutica que contiene, además del ingrediente activo (el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención en el caso de la primera composición farmacéutica de la presente invención, o un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente en el caso de la segunda composición farmacéutica de la presente invención), un transportador y/u otro aditivo farmacéuticamente aceptable. La formulación que usa un transportador y/u otro aditivo farmacéuticamente aceptable se puede transportar mediante, por ejemplo, los métodos descritos en la Universidad de las Ciencias en Filadelfia, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th EDITION", Lippincott Williams & Wilkins, (2000).

[0136]

Una forma de tal agente terapéutico o profiláctico es un líquido o forma liofilizada que se prepara disolviendo, suspendiendo o emulsionando los ingredientes en una solución acuosa o aceitosa estéril. Los ejemplos de tales solventes o soluciones disolventes en medios acuosos incluyen agua destilada para inyección y solución salina. Además, se pueden agregar osmóticos (por ejemplo, D-glucosa, D-sorbitol, D-manitol, cloruro de sodio, etc.), como también se pueden usar, en combinación, adyuvantes de disolución, como alcoholes (por ejemplo, etanol), polialcoholes (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), surfactantes no iónicos (por ejemplo, polisorbato 80, aceite de ricino 50 reforzado con polioxietileno), etc. Los líquidos basados en aceite también se pueden usar

como solventes o soluciones disolventes. Los ejemplos de tales líquidos aceitosos incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. También se pueden usar benzoato de bencilo, alcohol de bencilo, etc. como adyuvantes de disolución. En tales formulaciones, también se pueden usar aditivos según corresponda. Los ejemplos de aditivos incluyen: tampones (por ejemplo, tampón fosfato y tampón acetato), agentes suavizantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio y clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, albúmina sérica humana y polietilenglicol), conservantes (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido eritórbito y sus sales), colorantes (por ejemplo, clorofila de cobre, β caroteno, rojo N.º 2 y azul N.º 1), antisépticos (por ejemplo, paraoxibenzoato, fenol, cloruro de benzetonio y cloruro de benzalconio), engrosadores (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa y sus sales), agentes estabilizantes (por ejemplo, albúmina sérica humana, manitol y sorbitol) y desodorantes (por ejemplo, mentol y saborizante cítrico).

[0137]

Otras formas de agentes terapéuticos o profilácticos incluyen formas de dosificación sólidas como dispersiones, comprimidos, gránulos, cápsulas, píldoras, supositorios y pastillas. Las formas de dosificación sólidas administradas como preparaciones orales pueden contener aditivos como excipientes (por ejemplo, celulosa cristalina, lactosa y almidón), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio y talco), agentes aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y macrogol) y desintegrantes (por ejemplo, almidón y carboximetilcelulosa de calcio). Además, se pueden usar, según sea necesario, aditivos tales como conservantes (por ejemplo, alcohol bencílico, clorobutanol, paraoxibenzoato metílico, paraoxibenzoato propílico, etc.), antioxidantes, colorantes y agentes endulzantes. Otra forma de agente terapéutico o profiláctico se usa para aplicaciones en las mucosas. Este tipo de formulación puede contener adhesivos, promotores de adhesión, agentes viscosantes y promotores de viscosidad (por ejemplo, mucina, canten, gelatina, pectina, carragenina, alginato de sodio, goma de algarrobo, goma xantana, goma tragacanto, goma arábica, chitosán, pululán, almidón ceroso, sucralfato, celulosa y sus derivados) como aditivos, principalmente para otorgar absorción y retención en las mucosas. Sin embargo, la forma del agente terapéutico o profiláctico que se va a administrar al organismo vivo y el solvente y los aditivos aquí utilizados no se limitan a estos, y un experto en la técnica los puede seleccionar según corresponda.

[0138]

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener, además del ingrediente activo (el anticuerpo específico del anti-gpNMB de la presente invención en el caso de la primera composición farmacéutica de la presente invención, o un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) detallados anteriormente en el caso de la segunda composición farmacéutica de la presente

invención), otro fármaco conocido (ingrediente activo). Los ejemplos de tales otros fármacos conocidos (ingredientes activos) incluyen, aunque no a modo de limitación, varios fármacos terapéuticos para enfermedades neurológicas centrales, fármacos terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas, fármacos para la recuperación de la función nerviosa y fármacos terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer. Los ejemplos específicos incluyen anticuerpos anti-Tau, anticuerpos anti- β amiloide, anticuerpos anti-CD33, anticuerpos anti-semaforina 4D, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpos anti-sortilina, anticuerpos anti-lectina específica de galactosa (galectina) y anticuerpos anti-TREM2 (receptor de activación expresado en células mieloides 2). Estos se pueden usar solos o en combinación de dos o más.

[0139]

La composición farmacéutica de la presente invención también se puede combinar con otro fármaco conocido en forma de kit. Los ejemplos de otros fármacos (ingredientes activos) que se pueden combinar con el anticuerpo específico de anti-gpNMB de la presente invención incluyen los fármacos conocidos (ingredientes activos) descritos anteriormente para los fármacos combinables. La dosis de los fármacos distintos del anticuerpo específico de anti-gpNMB usada en forma de fármaco combinable o kit se puede determinar basándose en las dosis normalmente utilizadas para tratamiento, pero se puede aumentar o disminuir según las circunstancias.

[0140]

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral con el fin de aliviar los síntomas. Para la administración parenteral, se puede administrar, por ejemplo, como formulación intranasal, y se pueden seleccionar formulaciones líquidas, turbias o sólidas. Otra forma de dosis parenteral puede la inyectable, que se puede administrar por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intracerebroventricular o intraperitoneal. Otras formulaciones parenterales incluyen las correspondientes a la administración por vía transmucosal que no sea mediante supositorios, sublingual, transdérmica y otras distintas de la administración nasal. Además, el anticuerpo se puede administrar localmente por vía intravascular, contenida o aplicada en un stent o agente oclusivo intravascular. En algunos casos, también es posible administrar el anticuerpo en la forma de AND o ARN que codifica el anticuerpo, o en forma de células o bacterias comensales que producen el anticuerpo.

[0141]

La dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención varía según la edad, el sexo, el peso, los síntomas, el efecto terapéutico, el método de administración, el tiempo de tratamiento o el tipo de ingrediente activo contenido en la composición farmacéutica, etc. del paciente, pero generalmente puede ser de entre 0,1 mg

y 1 g, preferentemente entre 0,5 mg y 300 mg del ingrediente activo por adulto y por dosis. Se puede administrar entre una vez por semana y cada cuatro semanas o entre una vez por mes y cada seis meses. Sin embargo, la dosis y la frecuencia de administración pueden variar según diversas condiciones, por lo que pueden ser suficientes una dosis y/o una frecuencia de administración menores que la dosis y/o la frecuencia de administración anteriormente mencionadas, o puede ser necesarias una dosis y/o una frecuencia de administración mayores que la dosis y/o la frecuencia de administración anteriormente mencionadas. Además, el agente terapéutico o profiláctico descrito en la presente invención puede ser efectivo en un período de administración breve o se puede administrar durante un período prolongado, lo que disminuye los efectos secundarios.

[0142]

[Otros]

Como se explicó anteriormente, se puede esperar que el anticuerpo específico del anti-gpNMB de la presente invención exprese una o más de las actividades especificadas en los ítems (a) a (c) y (w) a (z) detallados a continuación cuando se administra a un sujeto, como un humano.

- (a) La actividad para reducir o eliminar las microglías deficientes.
- (b) La actividad para promover las funciones de las microglías normales con el fin de fagocitar las microglías deficientes o la actividad para normalizar la deficiencia de las microglías deficientes.
- (c) La actividad para mejorar el efecto de las microglías normales en las proximidades de las microglías deficientes.
- (w) La actividad para recuperar las funciones cognitivas.
- (x) La actividad para eliminar los oligómeros β amiloides.
- (y) La actividad para aumentar el número de sinapsis.
- (z) La actividad para tratar o prevenir las enfermedades neurodegenerativas.

[0143]

En consecuencia, además de la composición farmacéutica de la presente invención, el objeto de la presente invención puede incluir las siguientes formas de realización.

[0144]

En concreto, una forma de realización de la presente invención se relaciona con un método para lograr una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) y (w) a (z) anteriores en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención a un sujeto que lo necesite. Cuando el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención es un anticuerpo que expresa una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores, el método puede

preferiblemente estar destinado a lograr una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en el sujeto. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferiblemente, entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores, está la actividad especificada en (a) más arriba.

[0145]

Una forma de realización de la presente invención se relaciona con un método para lograr una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en un sujeto, que comprende administrar una cantidad efectiva de un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores (que puede ser, por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña o un fármaco macromolecular tal como un anticuerpo) a un sujeto que lo necesite. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferible entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores es la actividad especificada en (a) más arriba.

[0146]

Una forma de realización de la presente invención se relaciona con el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención para su uso en el logro de una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) y (w) a (z) anteriores en un sujeto. Cuando el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención es un anticuerpo que expresa una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores, el anticuerpo puede usarse preferiblemente para lograr una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en el sujeto. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferible entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores es la actividad especificada en (a) más arriba.

[0147]

Una forma de realización de la presente invención se relaciona con un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores (que puede ser, por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña o un fármaco macromolecular como un anticuerpo) para usar en el logro de una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en un sujeto. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferible entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores es la actividad especificada en (a) más arriba.

[0148]

Una forma de realización de la presente invención se relaciona con el uso del anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el logro de una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) y (w) a (z) anteriores en un sujeto. Cuando el anticuerpo específico anti-gpNMB de la presente invención es un anticuerpo que expresa una o más de las actividades especificadas en (a) a

(c) anteriores, el medicamento puede usarse preferiblemente para el logro de una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en el sujeto. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferible entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores es la actividad especificada en (a) más arriba.

[0149]

Una forma de realización de la presente invención se relaciona con el uso de un agente que tiene una o más de las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores (que puede ser, por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña o un fármaco macromolecular como un anticuerpo) en la fabricación de un medicamento para lograr una o más de las actividades en (w) a (z) anteriores en un sujeto. Otros detalles son como se explicó anteriormente. Preferible entre las actividades especificadas en (a) a (c) anteriores es la actividad especificada en (a) más arriba.

EJEMPLOS

[0150]

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle por medio de ejemplos. Estos ejemplos se muestran simplemente por conveniencia de la descripción, y no deben interpretarse como limitaciones de la presente invención en ningún sentido.

[0151]

[Procedimientos comunes]

*ELISA de antígeno (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas):

La gpNMB humana o de ratón soluble recombinante se diluyó con PBS a 2 µg/ml, se añadió a una placa de 96 pocillos (Nunc, MaxiSorp) a razón de 50 µl/pocillo y se dejó reposar durante la noche a 4 °C. La placa de 96 pocillos se bloqueó con BSA/PBS al 3% y se usó para ELISA como placa de 96 pocillos fijada con gpNMB soluble recombinante.

[0152]

Se añadió sobrenadante de cultivo de hibridoma que contenía un anticuerpo anti-gpNMB o una solución de BSA/PBS al 3% a razón de 30 µl/pocillo a la placa de 96 pocillos fijada con gpNMB soluble recombinante anterior, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón de lavado (TBS-T: Tris Buffered Saline, 0,025% Tween 20), se añadió conjugado de ALP-anticuerpo IgG anti-ratón (SBA, 1050-04), diluido 1000 veces en BSA/PBS al 3%, se añadió a razón de 30 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato (PNPP (fosfato de p-nitrofenilo), 1 mg/ml) a razón de 100 µl/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, y se calculó la absorbancia a 405-550 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se evaluaron como actividad de unión.

[0153]

*ELISA basado en células:

Las células que expresaban gpNMB se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta con polilisina y se permitió que se adhirieran, y se eliminó el sobrenadante del cultivo. A continuación, las células se fijaron con una solución que contenía formalina al 10% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las células se bloquearon con una solución de BSA/PBS al 3% y se almacenaron en condiciones de refrigeración.

[0154]

Después de retirar la solución de bloqueo de la placa fijada con células obtenida anteriormente, se añadió un medio de cultivo o solución que contenía anticuerpo a razón de 30 µl/pocillo, y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora a 1 hora y 30 minutos. Las células se lavaron de 2 a 4 veces con tampón de lavado (TBS-T) y se añadió a la placa una dilución de 1000 veces de solución de anticuerpo secundario marcado con IgG-HRP anti-ratón, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron de 2 a 4 veces con tampón de lavado (TBS-T), y luego se añadió solución de sustrato TMB a razón de 50 µL/pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se detuvo la reacción agregando ácido sulfúrico 1N a 50 µL/pocillo y se calculó la absorbancia a 450–650 nm. El valor de absorbancia obtenido se evaluó como actividad de unión.

[0155]

[Ejemplo 1] Producción y detección de anticuerpos monoclonales de ratón o rata (ELISA de antígeno y ELISA basado en células):

Los anticuerpos monoclonales de ratón o rata se pueden producir mediante el método de hibridoma descrito, por ejemplo, en Koehler *et al.*, Nature, (1975), 256:495–497. Se produjeron anticuerpos anti-gpNMB induciendo inmunidad en ratones o ratas usando ácidos nucleicos, proteínas o péptidos que contenían la secuencia de aminoácidos completa o parcial (SEQ ID NO 209) o la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO 210) de gpNMB humana (isotipo a), o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 211) o la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO 212) de gpNMB de ratón, y recolectando células de linfocitos de ratones o ratas con título elevado de anticuerpos. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las normas institucionales. La generación de hibridomas por fusión de células de linfocitos de ratones o ratas con líneas celulares de mieloma de ratón (P3U1 (P3X63Ag8U.1) o SP2/0 (SP2/0–Ag14)) se realizó usando técnicas estándar de hibridoma. Los hibridomas se seleccionaron usando el llamado medio HAT, que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. En la Figura 1 se muestra una alineación de secuencia de aminoácidos de gpNMB humana (isotipo a) (SEQ ID NO 209)

y gpNMB de ratón (SEQ ID NO 211), en la que la región en los residuos de aminoácidos 256 a 319 se muestra con líneas de puntos como un ejemplo del dominio PKD, y la región en los residuos de aminoácidos 172 a 246 se muestra con líneas continuas como un ejemplo del dominio similar a PMEL–CAF.

[0156]

Los cultivos de hibridoma resultantes se sometieron a ELISA de antígeno con gpNMB soluble humana recombinante fijada (SEQ ID NO 221) o gpNMB soluble de ratón (SEQ ID NO 223), o a ELISA basado en células con células que expresan proteínas que contienen gpNMB humana (SEQ ID NO 209) para evaluar la capacidad de unión, y se seleccionaron los pocillos que contenían hibridomas positivos. Los hibridomas de estos pocillos se clonaron individualmente mediante dilución limitante. Los hibridomas positivos de un solo clon se cultivaron, y los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de los medios de cultivo usando una columna de Proteína A (Ab–Capture, ProteNova) para obtener múltiples anticuerpos anti–gpNMB.

[0157]

[Ejemplo 2] Secuenciación de los anticuerpos:

Cada clon de anticuerpo anti–gpNMB obtenido en el Ejemplo 1 se sometió al método SMARTer^(TM) RACE para determinar las secuencias génicas de sus cadenas liviana y pesada. El ARN derivado del hibridoma que produce el anticuerpo se sometió al método SMARTer^(TM) RACE para obtener así fragmentos de genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, incluidos los codones de inicio y fin, y se determinaron sus secuencias de nucleótidos. Específicamente, la primera cadena de ADNc se sintetizó con el kit SMARTer^(TM) RACE 5'/3' (634859, Clontech) usando ARN total del hibridoma como plantilla, y el ADNc se amplificó mediante una reacción de PCR. Utilizando el ADNc como plantilla, las reacciones de PCR se realizaron utilizando cebadores para la secuencia universal proporcionada en el kit y cebadores específicos para cada una de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo. Los productos de PCR resultantes se usaron como productos de PCR 5'RACE para la clonación de TA.

[0158]

Al secuenciar un gen de anticuerpo monoclonal de rata, se realizaron reacciones de PCR en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo de rata, y los fragmentos de PCR resultantes se unieron a las regiones constantes de ratón para producir un anticuerpo quimérico de ratón, que luego se sometió a secuenciación.

[0159]

Para la clonación de TA, los productos de 5' RACE PCR se sometieron a electroforesis, y los fragmentos de ADNc que tenían los pesos moleculares deseados se

purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAEX II (20021, Qiagen). Los fragmentos de ADNc purificados se sometieron a reacción usando TaKaRa–Taq (R001A, Takara) a 72 °C durante 5 minutos para agregar adenina en el extremo 3'. A continuación, los fragmentos de ADNc se clonaron en el vector pMD20–T (en lo sucesivo denominado vector MD20) utilizando el kit de clonación Mighty TA (6028, Takara) según el protocolo adjunto. El vector MD20 en el que se clonaron los fragmentos de ADNc diana se transformó en TOP10 de *E. coli* y se cultivó en medio de agar que contenía 100 µg/ml de ampicilina. La inserción de los fragmentos de ADNc diana en el vector MD20 se confirmó mediante PCR de colonias. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de ADNc clonados. De igual modo, se determinaron las secuencias de nucleótidos de los productos de 3' RACE PCR, mediante lo cual se determinó la secuencia completa del gen para cada anticuerpo.

[0160]

De los clones de anticuerpo anti–gpNMB obtenidos en el Ejemplo 1, GPN05–1, GPN06–1, GPN07–1, GPN09–1, GPN11–10, GPN15–2, GPN15–3, GPN18–1, GPN18–2, GPN18–4, GPN18–5, GPN18–6, GPN18–7, y 1–5E se muestran en las Tablas 1–1 a 1–5, junto con los números de identificación de secuencia de las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de sus regiones variables de cadena pesada y cadena liviana (en lo sucesivo, también denominadas VH y VL, respectivamente) y las regiones determinantes de complementariedad incluidas en las mismas (en lo sucesivo, también denominadas CDR–H1 a H3 y CDR–L1 a L3, respectivamente), según se determina mediante los métodos explicados anteriormente.

[0161]

[Tabla 1–1]

Clon del anticuerpo	Descripción	Secuencia de aminoácidos		Secuencia de ácido nucleico	
GPN05-1	CDR-H1	SEQ ID NO	1	SEQ ID NO	2
	CDR-H2	SEQ ID NO	3	SEQ ID NO	4
	CDR-H3	SEQ ID NO	5	SEQ ID NO	6
	CDR-L1	SEQ ID NO	7	SEQ ID NO	8
	CDR-L2	SEQ ID NO	9	SEQ ID NO	10
	CDR-L3	SEQ ID NO	11	SEQ ID NO	12
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	13	SEQ ID NO	14
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	15	SEQ ID NO	16
GPN06-1	CDR-H1	SEQ ID NO	17	SEQ ID NO	18
	CDR-H2	SEQ ID NO	19	SEQ ID NO	20
	CDR-H3	SEQ ID NO	21	SEQ ID NO	22
	CDR-L1	SEQ ID NO	23	SEQ ID NO	24
	CDR-L2	SEQ ID NO	25	SEQ ID NO	26
	CDR-L3	SEQ ID NO	27	SEQ ID NO	28
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	29	SEQ ID NO	30
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	31	SEQ ID NO	32
GPN07-1	CDR-H1	SEQ ID NO	33	SEQ ID NO	34
	CDR-H2	SEQ ID NO	35	SEQ ID NO	36
	CDR-H3	SEQ ID NO	37	SEQ ID NO	38
	CDR-L1	SEQ ID NO	39	SEQ ID NO	40
	CDR-L2	SEQ ID NO	41	SEQ ID NO	42
	CDR-L3	SEQ ID NO	43	SEQ ID NO	44
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	45	SEQ ID NO	46
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	47	SEQ ID NO	48

[Tabla 1–2]

Clon del anticuerpo	Descripción	Secuencia de aminoácidos		Secuencia de ácido nucleico	
GPN11–10	CDR–H1	SEQ ID NO	49	SEQ ID NO	50
	CDR–H2	SEQ ID NO	51	SEQ ID NO	52
	CDR–H3	SEQ ID NO	53	SEQ ID NO	54
	CDR–L1	SEQ ID NO	55	SEQ ID NO	56
	CDR–L2	SEQ ID NO	57	SEQ ID NO	58
	CDR–L3	SEQ ID NO	59	SEQ ID NO	60
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	61	SEQ ID NO	62
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	63	SEQ ID NO	64
GPN15–2	CDR–H1	SEQ ID NO	65	SEQ ID NO	66
	CDR–H2	SEQ ID NO	67	SEQ ID NO	68
	CDR–H3	SEQ ID NO	69	SEQ ID NO	70
	CDR–L1	SEQ ID NO	71	SEQ ID NO	72
	CDR–L2	SEQ ID NO	73	SEQ ID NO	74
	CDR–L3	SEQ ID NO	75	SEQ ID NO	76
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	77	SEQ ID NO	78
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	79	SEQ ID NO	80
GPN15–3	CDR–H1	SEQ ID NO	81	SEQ ID NO	82
	CDR–H2	SEQ ID NO	83	SEQ ID NO	84
	CDR–H3	SEQ ID NO	85	SEQ ID NO	86
	CDR–L1	SEQ ID NO	87	SEQ ID NO	88
	CDR–L2	SEQ ID NO	89	SEQ ID NO	90
	CDR–L3	SEQ ID NO	91	SEQ ID NO	92
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	93	SEQ ID NO	94
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	95	SEQ ID NO	96

[Tabla 1–3]

Clon del anticuerpo	Descripción	Secuencia de aminoácidos		Secuencia de ácido nucleico	
GPN18–4	CDR–H1	SEQ ID NO	97	SEQ ID NO	98
	CDR–H2	SEQ ID NO	99	SEQ ID NO	100
	CDR–H3	SEQ ID NO	101	SEQ ID NO	102
	CDR–L1	SEQ ID NO	103	SEQ ID NO	104
	CDR–L2	SEQ ID NO	105	SEQ ID NO	106
	CDR–L3	SEQ ID NO	107	SEQ ID NO	108
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	109	SEQ ID NO	110
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	111	SEQ ID NO	112
GPN18–1	CDR–H1	SEQ ID NO	113	SEQ ID NO	114
	CDR–H2	SEQ ID NO	115	SEQ ID NO	116
	CDR–H3	SEQ ID NO	117	SEQ ID NO	118
	CDR–L1	SEQ ID NO	119	SEQ ID NO	120
	CDR–L2	SEQ ID NO	121	SEQ ID NO	122
	CDR–L3	SEQ ID NO	123	SEQ ID NO	124
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	125	SEQ ID NO	126
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	127	SEQ ID NO	128
GPN18–2	CDR–H1	SEQ ID NO	129	SEQ ID NO	130
	CDR–H2	SEQ ID NO	131	SEQ ID NO	132
	CDR–H3	SEQ ID NO	133	SEQ ID NO	134
	CDR–L1	SEQ ID NO	135	SEQ ID NO	136
	CDR–L2	SEQ ID NO	137	SEQ ID NO	138
	CDR–L3	SEQ ID NO	139	SEQ ID NO	140
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	141	SEQ ID NO	142
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	143	SEQ ID NO	144

[Tabla 1–4]

Clon del anticuerpo	Descripción	Secuencia de aminoácidos		Secuencia de ácido nucleico	
GPN18-6	CDR-H1	SEQ ID NO	145	SEQ ID NO	146
	CDR-H2	SEQ ID NO	147	SEQ ID NO	148
	CDR-H3	SEQ ID NO	149	SEQ ID NO	150
	CDR-L1	SEQ ID NO	151	SEQ ID NO	152
	CDR-L2	SEQ ID NO	153	SEQ ID NO	154
	CDR-L3	SEQ ID NO	155	SEQ ID NO	156
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	157	SEQ ID NO	158
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	159	SEQ ID NO	160
GPN18-7	CDR-H1	SEQ ID NO	161	SEQ ID NO	162
	CDR-H2	SEQ ID NO	163	SEQ ID NO	164
	CDR-H3	SEQ ID NO	165	SEQ ID NO	166
	CDR-L1	SEQ ID NO	167	SEQ ID NO	168
	CDR-L2	SEQ ID NO	169	SEQ ID NO	170
	CDR-L3	SEQ ID NO	171	SEQ ID NO	172
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	173	SEQ ID NO	174
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	175	SEQ ID NO	176
GPN18-5	CDR-H1	SEQ ID NO	177	SEQ ID NO	178
	CDR-H2	SEQ ID NO	179	SEQ ID NO	180
	CDR-H3	SEQ ID NO	181	SEQ ID NO	182
	CDR-L1	SEQ ID NO	183	SEQ ID NO	184
	CDR-L2	SEQ ID NO	185	SEQ ID NO	186
	CDR-L3	SEQ ID NO	187	SEQ ID NO	188
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	189	SEQ ID NO	190
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	191	SEQ ID NO	192

[Tabla 1–5]

Clon del anticuerpo	Descripción	Secuencia de aminoácidos		Secuencia de ácido nucleico	
1–5E	CDR–H1	SEQ ID NO	193	SEQ ID NO	194
	CDR–H2	SEQ ID NO	195	SEQ ID NO	196
	CDR–H3	SEQ ID NO	197	SEQ ID NO	198
	CDR–L1	SEQ ID NO	199	SEQ ID NO	200
	CDR–L2	SEQ ID NO	201	SEQ ID NO	202
	CDR–L3	SEQ ID NO	203	SEQ ID NO	204
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	205	SEQ ID NO	206
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	207	SEQ ID NO	208
GPN09–1	CDR–H1	SEQ ID NO	287	SEQ ID NO	288
	CDR–H2	SEQ ID NO	289	SEQ ID NO	290
	CDR–H3	SEQ ID NO	291	SEQ ID NO	292
	CDR–L1	SEQ ID NO	293	SEQ ID NO	294
	CDR–L2	SEQ ID NO	295	SEQ ID NO	296
	CDR–L3	SEQ ID NO	297	SEQ ID NO	298
	Región variable de cadena pesada (VH)	SEQ ID NO	299	SEQ ID NO	300
	Región variable de cadena liviana (VL)	SEQ ID NO	301	SEQ ID NO	302

[0162]

[Ejemplo 3] Análisis de la actividad de unión de los anticuerpos anti–gpNMB a microglía (ELISA celular):

Para evaluar la capacidad de unión de cada anticuerpo anti–gpNMB obtenido en el Ejemplo 1 a la microglía, se recolectaron células cerebrales de cerebros de ratones o ratas de 1 a 2 días de edad, se cultivaron durante aproximadamente 1 semana, y se recolectaron microglía de ratones o ratas agitando las células adherentes durante 1 hora para recoger las células desprendidas. La microglía de ratón o rata recolectada se suspendió en FBS al 20%/DMEM–GlutaMax, se sembró en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo, se cultivó en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 1 a 2 días para la unión, se fijó con Mild form, y luego se bloqueó con BSA/PBS al 3% para preparar una placa de ELISA celular.

[0163]

Después de retirar la solución de bloqueo de la placa ELISA fijada con microglía de ratón o rata, se añadió un diluyente del anticuerpo anti-gpNMB (solución de BSA/PBS al 3%) a razón de 30 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, después de lavar con tampón de lavado, se agregó un anticuerpo que reacciona específicamente con IgG de ratón, es decir, un conjugado de anticuerpo IgG anti-ratón-HRP (MBL, código n.º 330) a razón de 50 µL/pocillo o un conjugado de anticuerpo IgG anti-ratón-ALP (SBA, código n.º 1050-04) a razón de 30 µL/pocillo, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió sustrato para HRP (sustrato quimioluminiscente de peroxidasa ELISA-Star™, FUJIFILM Wako Pure Chemicals Corporation) a razón de 100 µL/pocillo, y la intensidad de luminiscencia se midió inmediatamente durante 1 a 10 segundos, y el valor de intensidad de luminiscencia obtenido se evaluó como actividad de unión. Como alternativa, se añadió sustrato para ALP (PNPP) a razón de 100 µL/pocillo y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, y se midió la absorbancia a 405 a 550 nm y se evaluó como actividad de unión. Los resultados confirmaron la actividad de unión de los anticuerpos anti-gpNMB a la microglía de ratón y rata.

[0164]

[Ejemplo 4] Análisis de los sitios de unión de los anticuerpos anti-gpNMB (ELISA de antígeno):

Para analizar los sitios de unión de cada anticuerpo anti-gpNMB obtenido en el Ejemplo 1 a la proteína gpNMB humana, se realizó el siguiente experimento.

[0165]

Primero, basado en la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de gpNMB humana (SEQ ID NO 215, en la que los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 21 constituyen un péptido de señal, mientras que los residuos de aminoácidos en las posiciones 22 y siguientes constituyen un péptido aislado del dominio extracelular de gpNMB humana), se produjeron una variante de delección N-terminal (hgpNMB_d07_76-498) y variantes de delección C-terminales (hgpNMB_d03_1-251, hgpNMB_d04_1-321, hgpNMB_d05_1-375, hgpNMB_d06_1-418, hgpNMB_d13_1-412, hgpNMB_d14_1-406, hgpNMB_d15_1-400, hgpNMB_d16_1-394, hgpNMB_d17_1-388, hgpNMB_d18_1-382 y hgpNMB_d19_1-234) del dominio extracelular de gpNMB humana como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Cada proteína gpNMB purificada se obtuvo mediante la construcción de un vector de expresión de células animales transitorio en el que se había insertado cada gen gpNMB, y expresándolo en un medio que usaba el Sistema de Expresión Expi293 (A14635, Thermo Fisher Scientific). A continuación, la proteína expresada se purificó en función de la afinidad con agarosa Ni-NTA (143-09763, FUJIFILM Wako) utilizando una etiqueta de histidina añadida al

extremo C para obtener así la proteína purificada.

[0166]

[Tabla 2]

Tabla 2: Variantes de delección N-terminal o C-terminal del dominio extracelular de gpNMB humana

Variante Nro.	Descripción
hgpNMB_d03_1–251	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 251 de hgpNMB
hgpNMB_d04_1–321	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 321 de hgpNMB
hgpNMB_d05_1–375	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 375 de hgpNMB
hgpNMB_d06_1–418	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 418 de hgpNMB
hgpNMB_d07_76–498	Variante de delección N-terminal consistente en 76 a 498 de hgpNMB
hgpNMB_d13_1–412	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 412 de hgpNMB
hgpNMB_d14_1–406	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 406 de hgpNMB
hgpNMB_d15_1–400	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 400 de hgpNMB
hgpNMB_d16_1–394	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 394 de hgpNMB
hgpNMB_d17_1–388	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 388 de hgpNMB
hgpNMB_d18_1–382	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 382 de hgpNMB
hgpNMB_d19_1–234	Variante de delección C-terminal consistente en 1 a 234 de hgpNMB

[0167]

A continuación, 17 nmol/L de cada gpNMB soluble humana recombinante purificada (SEQ ID NO 221), la variante de delección N-terminal (hgpNMB_d07_76–498) y las variantes de delección C-terminales (hgpNMB_d03_1–251, hgpNMB_d04_1–321, hgpNMB_d05_1–375, hgpNMB_d06_1–418, hgpNMB_d13_1–412, hgpNMB_d14_1–

406, hgpNMB_d15_1–400, hgpNMB_d16_1–394, hgpNMB_d17_1–388, hgpNMB_d18_1–382 y hgpNMB_d19_1–234) del dominio extracelular de gpNMB humana mostradas en la Tabla 2 anterior, y gpNMB soluble de ratón recombinante purificada (SEQ ID NO 223) se añadió a una placa de 96 pocillos para ELISA a razón de 100 µL/pocillo, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación, la placa se bloqueó con BSA/PBS al 3% para obtener así una placa ELISA de antígeno.

[0168]

Después de retirar la solución de bloqueo de la placa ELISA de antígeno, se añadió un diluyente del anticuerpo anti-gpNMB (solución de BSA/PBS al 3%) a razón de 50 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, después de lavar con tampón de lavado, se añadió un anticuerpo que reacciona específicamente con IgG de ratón, conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón–ALP (SBA, 1050–04) a razón de 50 µL/pocillo, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió sustrato (PNPP) a razón de 100 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 405 a 550 nm, y se evaluó como actividad de unión.

[0169]

[Ejemplo 5] Determinación de los epítomos de los anticuerpos anti-gpNMB (ELISA de antígeno):

Para determinar el epítomo de cada anticuerpo anti-gpNMB obtenido en el Ejemplo 1 en la proteína gpNMB humana, se realizó el siguiente experimento.

[0170]

Primero, se produjeron una variante de delección C-terminal (hgpNMB_d19_1–234) y mutantes puntuales (hgpNMB_d22_K245A, hgpNMB_d23_D252A, hgpNMB_d24_E253A, hgpNMB_d25_D264A, hgpNMB_d26_H272A, hgpNMB_d28_H297A, hgpNMB_d30_H376A, hgpNMBd31_D247A_R248A, hgpNMB_d34_D287A, hgpNMB_d35_H301A, hgpNMB_d36_R331A_K334A, hgpNMB_d37_K344A_D347A, hgpNMB_d38_D356A, hgpNMB_d39_E360A, hgpNMB_d40_E367A y hgpNMB_d41_R373A) del dominio extracelular de gpNMB humana como se muestra en la Tabla 3 a continuación. Cada proteína gpNMB purificada se obtuvo mediante la construcción de un vector de expresión de células animales transitorio en el que se había insertado cada gen de gpNMB, y la expresión en un medio utilizando el Sistema de Expresión Expi293 (A14635, Thermo Fisher Scientific). A continuación, la proteína expresada se purificó en función de la afinidad con agarosa Ni–NTA (143–09763, FUJIFILM Wako) utilizando una etiqueta de histidina añadida al extremo C para obtener así la proteína purificada. La variante de delección C-terminal y los

mutantes puntuales del dominio extracelular de gpNMB humana se resumen en la Tabla 3.

[0171]

[Tabla 3]

Tabla 3: Variantes de delección C–terminales y mutantes puntuales del dominio extracelular de gpNMB humana

Variante Nro.	Descripción
hgpNMB_d19_1–234	Variante de delección C–terminal consistente en 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d22_K245A	Mutante puntual K245A de hgpNMB
hgpNMB_d23_D252A	Mutante puntual D252A de hgpNMB
hgpNMB_d24_E253A	Mutante puntual E253A de hgpNMB
hgpNMB_d25_D264A	Mutante puntual D264A de hgpNMB
hgpNMB_d26_H272A	Mutante puntual H272A de hgpNMB
hgpNMB_d28_H297A	Mutante puntual H297A de hgpNMB
hgpNMB_d30_H376A	Mutante puntual H376A de hgpNMB
hgpNMBd31_D247A_R248A	Mutante puntual D247A y R248A de hgpNMB
hgpNMB_d34_D287A	Mutante puntual D287A de hgpNMB
hgpNMB_d35_H301A	Mutante puntual H301A de hgpNMB
hgpNMB_d36_R331A_K334A	Mutante puntual R331A y K334A de hgpNMB
hgpNMB_d37_K344A_D347A	Mutante puntual K344A y D347A de hgpNMB
hgpNMB_d38_D356A	Mutante puntual D356A de hgpNMB
hgpNMB_d39_E360A	Mutante puntual E360A de hgpNMB
hgpNMB_d40_E367A	Mutante puntual E367A de hgpNMB
hgpNMB_d41_R373A	Mutante puntual R373A de hgpNMB

[0172]

Estos mutantes puntuales de alanina del dominio extracelular de gpNMB humana se sometieron a análisis ELISA de antígeno utilizando el mismo procedimiento explicado en el Ejemplo 4 para evaluar la capacidad de unión de cada anticuerpo anti–gpNMB. Específicamente, cada una de las variantes de delección C–terminal y los mutantes puntuales de alanina del dominio extracelular de gpNMB humana que se muestran en la Tabla 2 anterior se agregaron a una placa de 96 pocillos para ELISA a una concentración de 17 nmol/L a razón de 100 µL/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación, la placa de ELISA de antígeno se bloqueó con

BSA/PBS al 3% para obtener una placa de ELISA de antígeno.

[0173]

Después de retirar la solución de bloqueo de la placa de ELISA de antígeno, se añadió un diluyente del anticuerpo anti-gpNMB (solución de BSA/PBS al 3%) a razón de 50 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, después de lavar con tampón de lavado, se agregó un anticuerpo que reacciona específicamente con IgG de ratón, es decir, un conjugado de anticuerpo IgG anti-ratón-ALP (SBA, 1050-04), a razón de 50 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió sustrato (PNPP) a razón de 100 µL/pocillo, se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, se calculó la absorbancia a 405 a 550 nm, y se evaluó como actividad de unión. En comparación con el mutante que mostró la absorbancia máxima a una concentración de 2 nM, los mutantes que mostraron una disminución de la absorbancia del 50% o más se marcan como +, y los que mostraron una absorbancia del 50% o más se marcan como -. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[0174]

[Tabla 4]

Tabla 4: Resultados del análisis de unión ELISA de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB a variantes de dominio extracelular de gpNMB humana

	GPN 05-1	GPN 06-1	GPN 07-1	GPN 09-1	GPN 11-10	GPN 15-2	GPN 15-3	GPN 18-4
22-234_N terminal	—	—	—	—	—	—	—	—
K245A	—	—	—	—	—	—	—	—
D252A	—	—	—	—	—	—	—	—
E253A	—	—	—	—	—	—	—	—
K257A,D258A	—	—	—	+	+	—	—	—
D264A	—	—	—	—	—	—	—	—
H268A,D269A	—	—	+	—	—	—	—	—
H272A	—	—	—	—	—	—	—	—
K282A	—	+	+	—	—	—	—	—
H297A	—	—	—	—	—	—	—	—
H376A	—	—	—	—	—	—	—	—
D247A,R248A	—	—	—	—	—	—	—	—
D287A	+	+	+	+	+	+	+	+
H301A	+	+	+	+	+	+	+	+
K316A	—	+	+	—	—	—	—	—
R331A,K334A	—	—	—	—	—	—	—	—
K344A,D347A	—	—	—	—	—	—	—	—
D356A	—	—	—	—	—	—	—	—
E360A	—	—	—	—	—	—	—	—
E367A	—	—	—	—	—	—	—	—
R373A	—	—	—	—	—	—	—	—
E385A	—	—	—	+	+	—	—	—

[0175]

Además, los anticuerpos anti-gpNMB que se unieron a un mutante de delección C-terminal del dominio extracelular de gpNMB humana (hgpNMB_d19_1-234) se sometieron a análisis para determinar la capacidad de unión a mutantes puntuales de alanina del dominio extracelular de gpNMB humana N-terminal usando ELISA de antígeno de manera similar.

[0176]

Primero, se generaron una variante de delección C-terminal (hgpNMB_d19_1–234) y mutantes puntuales (hgpNMB_d19_1–234, hgpNMB_d43_1–234_R77A, hgpNMB_d44_1–234_D85A, hgpNMB_d45_1–234_R104A, hgpNMB_d47_1–234_E117A,K118A, hgpNMB_d48_1–234_R121A,E123A, hgpNMB_d49_1–234_D129A, hgpNMB_d50_1–234_E140A,D141A, hgpNMB_d51_1–234_D143A,E145A, hgpNMB_d52_1–234_H152A,H153A, hgpNMB_d53_1–234_D158A,K160A, hgpNMB_d54_1–234_H164A,H165A, hgpNMB_d55_1–234_R169A, hgpNMB_d58_1–234_R189A, hgpNMB_d59_1–234_R193A, hgpNMB_d61_1–234_R214A,R215A y hgpNMB_d64_1–234_D109A) del dominio extracelular de gpNMB humana que se muestra en la Tabla 5 a continuación. Cada proteína gpNMB purificada se obtuvo mediante la construcción de un vector de expresión de células animales transitorio en el que se había insertado cada gen de gpNMB y la expresión en un medio utilizando el Sistema de Expresión Expi293 (A14635, Thermo Fisher Scientific). A continuación, la proteína expresada se purificó en función de la afinidad con agarosa Ni-NTA (143–09763, FUJIFILM Wako) utilizando una etiqueta de histidina añadida al extremo C para obtener así la proteína purificada. La variante de delección C-terminal y los mutantes puntuales del dominio extracelular de gpNMB humana se resumen en la Tabla 5.

[0177]

[Tabla 5]

Tabla 5: Variante de delección C-terminal y mutantes puntuales del dominio extracelular de gpNMB humana

Variante Nro.	Descripción
hgpNMB_d19_1–234	Variante de delección C-terminal Consistente en 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d43_1–234_R77A	Mutante puntual R77A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d44_1–234_D85A	Mutante puntual D85A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d45_1–234_R104A	Mutante puntual R104A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d47_1– 234_E117A,K118A	Mutante puntual E117A y K118A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d48_1– 234_R121A,E123A	Mutante puntual R121A y E123A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d49_1–234_D129A	Mutante puntual D129A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d50_1– 234_E140A,D141A	Mutante puntual E140A y D141A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d51_1– 234_D143A,E145A	Mutante puntual D143A y E145A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d52_1– 234_H152A,H153A	Mutante puntual H152A y H153A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d53_1– 234_D158A,K160A	Mutante puntual D158A y K160A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d54_1– 234_H164A,H165A	Mutante puntual H164A y H165A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d55_1–234_R169A	Mutante puntual R169A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d58_1–234_R189A	Mutante puntual R189A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d59_1–234_R193A	Mutante puntual R193A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d61_1– 234_R214A,R215A	Mutante puntual R214A y R215A de 1 a 234 de hgpNMB
hgpNMB_d64_1–234_D109A	Mutante puntual D109A de 1 a 234 de hgpNMB

[0178]

Estos mutantes puntuales de alanina del dominio extracelular de gpNMB humana se sometieron a análisis ELISA de antígeno utilizando el mismo procedimiento explicado en el Ejemplo 4 para evaluar la capacidad de unión de cada anticuerpo anti-gpNMB. Específicamente, cada una de las variantes de delección C-terminal y los mutantes puntuales de alanina del dominio extracelular de gpNMB humana que se muestran en la

Tabla 5 anterior se agregaron a una placa de 96 pocillos para ELISA a una concentración de 17 nmol/L a razón de 100 µL/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación, la placa de ELISA de antígeno se bloqueó con BSA/PBS al 3% para obtener una placa de ELISA de antígeno.

[0179]

Después de retirar la solución de bloqueo de la placa de ELISA de antígeno, se añadió un diluyente del anticuerpo anti-gpNMB (solución de BSA/PBS al 3%) a razón de 50 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, después de lavar con tampón de lavado, se agregó un anticuerpo que reacciona específicamente con IgG de ratón, es decir, un conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón-ALP (SBA, 1050-04), a razón de 50 µL/pocillo y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió sustrato (PNPP) a razón de 100 µL/pocillo y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, y se calculó la absorbancia a 405 a 550 nm y se evaluó como actividad de unión. Los resultados se muestran en la Tabla 6 (como se mencionó anteriormente, en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO 215, los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 21 constituyen un péptido de señal, mientras que los residuos de aminoácidos en las posiciones 22 y siguientes constituyen un péptido aislado del dominio extracelular de gpNMB humana. Por consiguiente, cada proteína mutante que se muestra en la Tabla 6 comienza en el residuo de aminoácido en la posición 22.). La actividad de unión al mutante de delección C-terminal (hgpNMB_d19_22-234) se establece en 100%, los mutantes que mostraron una absorbancia del 50% o menos se marcan como +, y los que mostraron una absorbancia del 50% o más se marcan como -.

[0180]

[Tabla 6]

Tabla 6: Resultados del análisis de unión ELISA de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB a variantes del dominio extracelular de gpNMB humana

Proteína variante gpNMB	GPN 18-1	GPN 18-2	GPN 18-5	GPN 18-6	GPN 18-7
22-234_N terminal	—	—	—	—	—
22-234_R77A	—	—	—	—	—
22-234_D85A	—	—	+	—	—
22-234_R104A	—	—	—	—	—
22-234_D109A	—	—	—	—	—
22-234_E117A,K118A	—	—	—	—	—
22-234_R121A,E123A	—	—	—	—	—
22-234_D129A	—	—	—	—	—
22-234_E140A,D141A	—	—	—	—	—
22-234_D143A,E145A	—	—	—	—	—
22-234_H152A,H153A	—	—	—	—	—
22-234_D158A,K160A	—	—	—	—	—
22-234_H164A,H165A	—	—	—	—	—
22-234_R169A	—	—	—	—	—
22-234_K186A	—	—	—	+	—
22-234_R189A	—	—	—	—	—
22-234_R193A	—	—	—	—	—
22-234_R214A,R215A	+	+	—	+	+
22-234_H216A, R218A	+	+	—	—	+

[0181]

El epítipo de cada anticuerpo anti-gpNMB se determinó considerando la estabilidad del mutante gpNMB purificado y los sitios de mutación que afectaban la unión.

Los resultados mostraron que los clones de anticuerpo GPN18-1, GPN18-2, GPN18-6 y GPN18-7 interactúan con los aminoácidos presentes en la región similar a PMEL-CAF (R214 y/o R215). Por otro lado, se encontró que el clon de anticuerpo GPN18-5 reconoce aún más la porción N-terminal. El clon de anticuerpo 1-5E es un anticuerpo anti-gpNMB obtenido por inmunización con el péptido de vacuna identificado en un informe anterior (Bibliografía No Patentada 36), y el epítipo reconocido por este anticuerpo es "RRGDGRWKD" en los residuos de aminoácidos 63 a 71 en el extremo N.

[0182]

[Ejemplo 6] Producción de anticuerpos anti-gpNMB recombinantes:

Los plásmidos se prepararon añadiendo una secuencia génica que codifica una secuencia de señal al extremo 5' de cada secuencia génica que codifica la cadena H y una secuencia génica que codifica la cadena L del anticuerpo anti-gpNMB obtenido en el Ejemplo 2, e insertando cada una de las secuencias génicas en el vector de expresión de células animales pcDNA3.4. A continuación, los plásmidos preparados se expresaron de forma transitoria utilizando el Sistema de Expresión ExpiCHO (A29133, Thermo Fisher Scientific) de modo que los anticuerpos se secretaran en el medio. A continuación, el sobrenadante del cultivo se recogió y se purificó utilizando una columna de proteína A (Ab-Capture, Protenova) y una columna de filtración en gel (Superdex 200 Increase, Cytiva).

[0183]

[Ejemplo 7(1)] Análisis de interacción de los anticuerpos anti-gpNMB por el método de resonancia de plasmón superficial – 1

Para comparar las propiedades de unión (cinética de unión y disociación) de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB obtenido en el Ejemplo 1 con gpNMB, se realizó una medición de resonancia de plasmón superficial (SPR). Específicamente, se usaron las siguientes condiciones.

[0184]

Como sistema de medición se utilizó el sistema BIACORE T200. Se fijó un anticuerpo monoclonal anti-etiqueta His a aproximadamente 5000 RU en todas las celdas de flujo del chip sensor CM5 (BR-1005-30, Cytiva) con el Kit de Acoplamiento de Amina (BR-1000-50, GE) y el Kit de Captura de His (28-9950-56, Cytiva). El tampón de ejecución utilizado fue HBS-EP+ (BR-1006-69, Cytiva).

[0185]

Se capturó gpNMB-FLAG-His de humano recombinante (SEQ ID NO 221) o gpNMB-FLAG-His de ratón recombinante (SEQ ID NO 223) en el sistema de medición y se usó como ligando. Cada clon de anticuerpo anti-gpNMB se usó a una concentración de 100 nmol/L como analito. Se usó anticuerpo de toxina Shiga 2 (toxina Shiga 2) (11E10) o IgG1 de ratón de control (leinco: Pro# M1411) como control negativo del analito.

[0186]

La temperatura del sistema de medición se fijó en 25 °C. Como ligando, gpNMB-FLAG-His de humano recombinante se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-His en la celda de flujo (2) para lograr 100 RU o menos, y gpNMB-FLAG-His de ratón recombinante se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal anti-His en la celda

de flujo (4) para lograr 100 RU o menos. La velocidad de flujo se ajustó a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, y 10 nmol/L de IgG2a de ratón purificada, κ , Control de Isotipo, Clon: MG2a-53 (401502, BioLegend, en adelante IgG2a de control) se hizo reaccionar durante 1 minuto, y HBS-EP+ se hizo fluir durante al menos 10 minutos. El analito se diluyó con HBS-EP+ (100 nmol/L) y se hizo reaccionar con todas las celdas de flujo durante 600 segundos cada una para obtener una curva de unión, y luego se hizo reaccionar con HBS-EP+ durante 600 segundos para obtener una curva de disociación.

[0187]

Después de la reacción, el tampón de regeneración 1 (SDS 0,2%), tampón de regeneración 2 (100 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,5), 1 mol/L de NaCl, 15 mmol/L de MgCl_2) y tampón de regeneración 3 (10 mmol/L de glicina-HCl (pH 1,5)) se hicieron reaccionar durante 1 minuto cada uno para eliminar y lavar gpNMB-FLAG-His en el sistema de medición. Se utilizó el software de evaluación Biacore T200 (versión 2.0) para analizar los datos con el Modelo de Unión 1:1, y el valor de tasa de unión (Ass: 1/Ms), el valor de estabilidad de unión (Diss: 1/s) y el valor de disociación de equilibrio (Diss/Ass: M) se cuantificaron como números ordinales. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

[0188]

[Tabla 7]

Tabla 7: Resultados del análisis de interacción por SPR de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB contra gpNMB de humano y gpNMB de ratón – 1

Clon de anticuerpo		gpNMB de humano			gpNMB de ratón		
Muestra	Dominio reconocido	Ass. (1/Ms)	Diss (1/s)	Diss/Ass (M)	Ass (1/Ms)	Diss (1/s)	Diss/Ass (M)
GPN05–1	PKD	4.8.E+04	1.6.E–04	3.3.E–09	6.1.E+04	1.3.E–03	2.0.E–08
GPN06–1	PKD	3.4.E+05	4.9.E–04	1.4.E–09	1.5.E+05	1.8.E–03	1.2.E–08
GPN09–1	PKD	–	–	–	1.6.E+05	4.2.E–04	2.6.E–09
GPN11–10	PKD	8.1.E+04	1.0.E–03	1.3.E–08	7.5.E+04	3.7.E–04	4.9.E–09
GPN15–2	PKD	1.7.E+05	6.0.E–07	3.5.E–12	1.4.E+05	2.8.E–04	2.0.E–09
GPN15–3	PKD	1.3.E+05	3.7.E–04	2.9.E–09	1.3.E+05	3.6.E–04	2.9.E–09
GPN18–4	PKD	4.7.E+04	1.5.E–05	3.2.E–10	3.0.E+04	1.2.E–04	3.8.E–09
GPN18–1	Tipo PMEL –CAF	3.8.E+04	5.4.E–04	1.4.E–08	3.8.E+04	9.1.E–04	2.4.E–08
GPN18–2	Tipo PMEL –CAF	3.1.E+04	6.8.E–05	2.2.E–09	2.4.E+04	7.9.E–05	3.3.E–09
GPN18–6	Tipo PMEL –CAF	2.7.E+04	6.5.E–04	2.4.E–08	3.2.E+04	9.8.E–04	3.1.E–08
GPN18–7	Tipo PMEL –CAF	2.6.E+04	5.9.E–04	2.3.E–08	2.0.E+04	9.9.E–04	4.9.E–08
GPN18–5	N–frg.	1.5.E+05	3.0.E–04	2.0.E–09	9.1.E+04	7.0.E–04	7.7.E–09
1–5E	Vacuna N– terminal	–	–	–	6.7.E+05	6.1.E–03	9.1.E–09

[0189]

[Ejemplo 7(2)] Análisis de interacción de los anticuerpos anti-gpNMB por el método de resonancia de plasmón superficial – 2

Dos de los clones de anticuerpo anti-gpNMB obtenidos en el Ejemplo 1, GPN05–1 y GPN06–1, se sometieron a medición de las propiedades de unión dependientes de la concentración (cinética de unión y disociación) a gpNMB mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) para su investigación. Específicamente, se usaron las mismas condiciones que en el Ejemplo 7(1), excepto por las condiciones que se describen a continuación.

[0190]

Se usó el chip sensor CM3 (BR–1005–36, Cytiva), y los clones de anticuerpo

anti-gpNMB GPN05-1 y GPN06-1 se usaron como analitos a distintas concentraciones cada uno. Las condiciones de medición se determinaron de acuerdo con el método de cinética de ciclo único. El analito en cada concentración se hizo reaccionar durante 450 segundos para obtener una curva de unión, y HBS-EP+ se hizo reaccionar durante 600 segundos para obtener una curva de disociación. Después de la reacción, el tampón de regeneración 1 (SDS 0,2%), tampón de regeneración 2 (100 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,5), 1 mol/L de NaCl, 15 mmol/L de MgCl₂) y tampón de regeneración 3 (10 mmol/L de glicina-HCl (pH 1,5)) se hicieron reaccionar durante 1 minuto cada uno para eliminar y lavar gpNMB-FLAG-His en el sistema de medición. Se utilizó el software de evaluación Biacore T200 (versión 2.0) para analizar los datos con el Modelo de Unión 1:1, y se calculó el valor de tasa de unión (Ass: 1/Ms), el valor de estabilidad de unión (Diss: 1/s) y el valor de disociación de equilibrio (Diss/Ass: M). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

[0191]

[Tabla 8]

Tabla 8: Resultados del análisis de interacción por SPR de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB contra gpNMB de humano gpNMB de ratón – 2

Ligando	Clon	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
gpNMB de humano	GPN05-1	9.69E+04	3.55E-05	3.66E-10
	GPN06-1	5.19E+05	2.53E-04	4.88E-10
gpNMB de ratón	GPN05-1	3.61E+04	3.07E-04	8.50E-09
	GPN06-1	1.74E+05	8.79E-04	5.05E-09

[0192]

[Ejemplo 8] Análisis de unión de anticuerpo anti-gpNMB (anticuerpo policlonal comercial) en ratones de modelo de enfermedad de Alzheimer

Los ratones APOsk de 21 a 25 meses de edad se fijaron con reflujos, se extirparon sus cerebros y se prepararon secciones de parafina de 5 µm de espesor. Después de la desparafinación, las secciones de cerebro se hirvieron en tampón de citrato (pH 6) durante 30 minutos para activar el antígeno y luego se tiñeron dos veces con el anticuerpo policlonal anti-gpNMB AF2330 disponible comercialmente (2 µg/ml) + FITC-anticuerpo IgG anti-cabra de burro (Jackson Lab) y anticuerpo Iba1 (WAKO, 5 µg/ml) + rodamina-anticuerpo IgG anti-conejo de burro (Jackson Lab). Después del tratamiento con extintor de lipofusina TrueBlackplus (Biotium) durante 10 minutos a temperatura ambiente, las secciones se encapsularon con encapsulante que contenía DAPI (Vector).

[0193]

Los resultados mostraron que las secciones del cerebro de los ratones APPosk de 21 a 25 meses de edad incluían células teñidas con el anticuerpo anti-gpNMB (AF2330, R&D) entre la microglía positiva para Iba1, y que casi todas las células positivas para gpNMB eran microglía positiva para Iba1. Los resultados también mostraron que la microglía que experimentó cambios morfológicos era microglía positiva para gpNMB. Estos hallazgos confirman que la microglía positiva para gpNMB aparece en los ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer (ratones APPosk).

[0194]

[Ejemplo 9] Reducción de microglía positiva para gpNMB mediante la administración de anticuerpos anti-gpNMB (GPN05-1 y GPN06-1) a ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer:

Los ratones APPosk de 19 a 20 meses de edad se dividieron en dos grupos (dos machos y tres hembras en cada grupo), y a cada grupo se le inyectó por vía intraperitoneal un clon de anticuerpo anti-gpNMB diferente obtenido en el Ejemplo 1 (GPN05-1 o GPN06-1) una vez a la semana por un total de cinco veces (1 mg/400 µL en PBS cada vez). Cuatro días después de la última dosis, los ratones se fijaron en reflujó, se extirparon sus cerebros, y se prepararon secciones de parafina de 5 µm de espesor. Después de la desparafinización, las secciones de cerebro se hirvieron en tampón de citrato (pH 6) durante 30 minutos para activar el antígeno y luego se tiñeron dos veces con anticuerpo policlonal de cabra anti-gpNMB de ratón (R&D Systems, #AF2330, 2 µg/ml) + FITC-anticuerpo IgG anti-cabra de burro (Jackson Lab) y anticuerpo Iba1 (WAKO, 5 µg/ml) + rodamina-anticuerpo IgG anti-conejo de burro (Jackson Lab). Después del tratamiento con extintor de lipofusina TrueBlackplus (Biotium) durante 10 minutos a temperatura ambiente, las secciones se encapsularon con encapsulante que contenía DAPI (Vector). Un macho del grupo de GPN06-1 murió la semana después de la cuarta dosis. Como controles, se tiñeron de la misma manera secciones de cerebro de ratones APPosk de 21 a 25 meses de edad (3 ratones). Las fotografías inmunoteñidas resultantes se muestran en la Figura 2. La Figura 2(A) muestra el control, la Figura 2(B) muestra el grupo tratado con GPN05-1, y la Figura 2(C) muestra el grupo tratado con GPN06-1.

[0195]

Los resultados mostraron que los ratones APPosk de control tenían numerosas microglías positivas para gpNMB (positivas para Iba1) detectadas con el anticuerpo policlonal de cabra anti-gpNMB de ratón en el hipocampo (CA2-CA3), la corteza entorrinal (Ent) y la circunvolución dentada (DG). Por otro lado, la microglía positiva para gpNMB se redujo en el grupo tratado con GPN05-1 y estuvo casi ausente en el grupo tratado con GPN06-1. Estos resultados confirman que la administración de los anticuerpos monoclonales anti-gpNMB GPN05-1 y GPN06-1 reducen la microglía positiva para

gpNMB en el cerebro.

[0196]

Además, se realizó un análisis estadístico de los resultados de inmunotinción anteriores. En concreto, se extrajeron la señal de tinción de Iba1 y la señal de cotinción de gpNMB e Iba1, y se cuantificó el área de cada región de tinción mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Los valores obtenidos se plasmaron en un gráfico como se muestra en la Figura 3. La prueba de diferencia significativa se realizó mediante ANOVA entre los tres grupos utilizando StatView, y solo aquellos resultados que estaban por debajo del valor p de 0,05 por PLSD de Fisher se consideraron “significativamente diferentes”, y sus valores p se indican en el gráfico.

[0197]

Los resultados de este análisis confirman que la administración de los anticuerpos monoclonales anti-gpNMB GPN05-1 y GPN06-1 redujo la microglía positiva para gpNMB en el cerebro con diferencias estadísticamente significativas. Esto significa que se redujo la microglía con mal funcionamiento, que representa al menos una parte de la microglía positiva para gpNMB. Tal reducción de la microglía con mal funcionamiento también está respaldada por la eliminación de los oligómeros A β como se muestra en el Ejemplo 10 y la restauración del número de sinapsis como se muestra en el Ejemplo 11.

[0198]

[Ejemplo 10] Eliminación de oligómeros A β mediante la administración de anticuerpos anti-gpNMB (GPN05-1 y GPN06-1) a ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer:

Los ratones APPosk de 19 a 20 meses de edad se dividieron en dos grupos (dos machos y tres hembras en cada grupo), y a cada grupo se le administró por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-gpNMB diferente obtenido en el Ejemplo 1 (GPN05-1 o GPN06-1) una vez a la semana por un total de cinco veces (1 mg/400 μ L en PBS cada vez). Cuatro días después de la última dosis, los ratones se fijaron en reflujó, se extirparon sus cerebros, y se prepararon secciones de parafina de 5 μ m de espesor. Después de la desparafinización, las secciones de cerebro se hirvieron en ácido clorhídrico (pH 2) durante 10 minutos y se tiñeron con anticuerpo oligomérico A β 11A1 (IBL, 1 μ g/ml) + biotina-anticuerpo IgG anti-ratón de caballo (Vector) + ABC elite (Vector) + DAB. Como controles, se tiñeron de la misma manera secciones de cerebro de ratones APPosk de 21 a 25 meses de edad (3 ratones). Las fotografías inmunoteñidas resultantes se muestran en la Figura 4. La Figura 4(A) muestra el control, la Figura 4(B) muestra el grupo tratado con GPN05-1, y la Figura 4(C) muestra el grupo tratado con GPN06-1.

[0199]

Los resultados mostraron que se encontraron células positivas para el oligómero

A β en el hipocampo y la circunvolución dentada en los ratones APPosk de control. Por otra parte, las células positivas para 11A1 se redujeron en el grupo tratado con GPN05–1 y casi no se observaron en el grupo tratado con GPN06–1. Estos resultados confirman que la administración de anticuerpos anti–gpNMB eliminó los oligómeros A β en el cerebro.

[0200]

[Ejemplo 11] Restauración de sinapsis mediante la administración de anticuerpos anti–gpNMB (GPN05–1 y GPN06–1) a ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer:

Los ratones APPosk de 19 a 20 meses de edad se dividieron en dos grupos (dos machos y tres hembras en cada grupo), y a cada grupo se le administró por vía intraperitoneal un anticuerpo anti–gpNMB diferente obtenido en el Ejemplo 1 (GPN05–1 o GPN06–1) una vez a la semana por un total de cinco veces (1 mg/400 μ L en PBS cada vez). Cuatro días después de la última dosis, los ratones se fijaron en refluo, se extirparon sus cerebros, y se prepararon secciones de parafina de 5 μ m de espesor. Después de la desparafinización, las secciones de cerebro se hirvieron en tampón de citrato (pH 6) durante 30 minutos y se tiñeron con anticuerpo de sinaptofisina SVP–38 (Sigma, dilución 200x) + FITC–anticuerpo IgG anti–ratón de cabra (Jackson Lab). Las secciones de cerebro de ratones no transgénicos (no Tg) de 20 meses de edad (2 ratones) como Control 1 y las secciones de cerebro de ratones APPosk de 21 a 25 meses de edad (3 ratones) como Control 2 se tiñeron de la misma manera. Las fotografías inmunoteñidas resultantes se muestran en la Figura 5. La Figura 5(A) muestra el grupo de Control 1 (ratones no Tg), la Figura 5(B) muestra el grupo de Control 2 (ratones APPosk), la Figura 5(C) muestra el Grupo tratado con GPN05–1, y la Figura 5(D) muestra el grupo tratado con GPN06–1.

[0201]

Los resultados mostraron que la sinaptofisina en las fibras musgosas del hipocampo en los ratones APPosk de Control 2 disminuyó en comparación con los ratones no transgénicos (No Tg) de Control 1. El nivel de sinaptofisina se recuperó ligeramente en el grupo tratado con GPN05–1 y notablemente en el grupo tratado con GPN06–1. La recuperación de sinaptofisina pareció correlacionarse con la eliminación de oligómeros A β . Estos resultados sugieren que la administración de los anticuerpos anti–gpNMB aumentó el número de sinapsis y restauró las funciones neuronales en los cerebros de ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer.

[0202]

[Ejemplo 12–1] Evaluación de la eficacia farmacológica de anticuerpos anti–gpNMB (GPN09–1, GPN11–10, GPN15–2, GPN15–3, GPN18–2 y 11E10) en ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer (eliminación de oligómeros A β)

Los ratones APPosk de 19–20 meses de edad se dividieron en 6 grupos (4 ratones en cada grupo), y a cada grupo se le administró por vía intraperitoneal un anticuerpo anti–

gpNMB diferente obtenido en el Ejemplo 1 (GPN09–1, GPN11–10, GPN15–2, GPN15–3 o GPN18–2) o el anticuerpo de control 11E10 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-toxina Shiga), una vez a la semana por un total de 5 veces (1 mg/400 μ L en PBS para cada dosis). Cuatro días después de la última dosis, los ratones se fijaron en reflujó, se extirparon sus cerebros, y se prepararon secciones de parafina de 5 μ m de espesor. Después de la desparafinización, las secciones de cerebro se hirvieron en ácido clorhídrico (pH 2) durante 10 minutos y se tiñeron con anticuerpo oligomérico A β 11A1 (IBL, 1 μ g/ml) + biotina–anticuerpo IgG anti–ratón de caballo (Vector) + ABC elite (Vector) + DAB.

[0203]

Las fotografías inmunoteñidas obtenidas se muestran en la Figura 6. La Figura 6(A) muestra el grupo tratado con el anticuerpo de Control 1 1E10, la Figura 6(B) muestra el grupo tratado con GPN09–1, la Figura 6(C) muestra el grupo tratado con GPN11–10, la Figura 6(D) muestra el grupo tratado con GPN15–2, la Figura 6(E) muestra el grupo tratado con GPN15–3, y la Figura 6(F) muestra el grupo tratado con GPN18–2.

[0204]

Además, se cuantificó la tinción del oligómero A β intracelular para las fotografías inmunoteñidas en la Figura 6, y se llevó a cabo la prueba de diferencia significativa por ANOVA para los tres grupos usando StatView. Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 7. Solo los datos con valores de p por debajo de 0,05 por PLSD de Fisher se consideraron "significativamente diferentes", y sus valores de p se indican en el gráfico. Los resultados mostraron que los ratones APPosk del grupo tratado con anticuerpo de control mostraron células positivas para la tinción de 11A1 en la corteza cerebral. Por otro lado, el número de células positivas para la tinción con 11A1 disminuyó en los grupos tratados con GPN09–1, GPN11–10, GPN15–2 y GPN15–3, y estuvo casi ausente en el grupo tratado con GPN18–2. Estos resultados confirman que la administración de los anticuerpos anti–gpNMB eliminó los oligómeros A β en el cerebro.

[0205]

Además, las secciones de hipocampo de los ratones APPosk tratados con GPN18–2 y las de ratones no Tg de aproximadamente la misma edad se sometieron a tinción con sinaptofisina de acuerdo con el método del Ejemplo 11. Las fotografías teñidas resultantes se muestran en la Figura 8. La Figura 8(A) y la Figura 8(B) muestran el grupo de control (ratones no Tg) y el grupo tratado con GPN18–2, respectivamente. Los resultados muestran que el número de sinapsis en el hipocampo de los ratones APPosk tratados con GPN18–2 se restauró al nivel No Tg.

[0206]

[Ejemplo 12–2] Evaluación de la eficacia farmacológica de anticuerpos anti–gpNMB

(GPN18–2, GPN06–1, GPN18–5, 1–5E y anticuerpo monoclonal anti–BTV de ratón) en ratones de modelo de enfermedad de Alzheimer (eliminación de oligómeros A β)

Los ratones APPosk de 18 a 20 meses de edad se dividieron en 5 grupos (5 ratones por grupo), y cada grupo se trató con un anticuerpo anti–gpNMB diferente obtenido en el Ejemplo 1 (GPN18–2, GPN06–1, GPN18–5 o 1–5E) o un anticuerpo de control (anticuerpo monoclonal anti–BTV de ratón, Leinco Technologies, Inc.) por vía intraperitoneal una vez a la semana durante un total de cinco veces (1 mg/400 μ L en PBS para cada dosis). Cuatro días después de la última dosis, los ratones se fijaron en reflujó, se extirparon sus cerebros, y se prepararon secciones de parafina de 5 μ m de espesor. Después de la desparafinización, las secciones de cerebro se hirvieron en ácido clorhídrico (pH 2) durante 10 minutos y se tiñeron con anticuerpo oligomérico A β 11A1 (IBL, 1 μ g/ml) + biotina–anticuerpo IgG anti–ratón de caballo (Vector) + ABC elite (Vector) + DAB.

[0207]

Las fotografías inmunoteñidas obtenidas se muestran en la Figura 9. La Figura 9(A) muestra el grupo tratado con el anticuerpo Control, la Figura 9(B) muestra el grupo tratado con GPN18–2, la Figura 9(C) muestra el grupo tratado con GPN06–1, la Figura 9(D) muestra el grupo tratado con GPN18–5, y la Figura 9(E) muestra el grupo tratado con 1–5E.

[0208]

Además, se cuantificó la tinción del oligómero A β intracelular para las fotografías inmunoteñidas de la Figura 9, y se llevó a cabo la prueba de diferencia significativa por ANOVA para los tres grupos usando StatView. Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 10. Solo los datos con valores de p inferiores a 0,05 según PLSD de Fisher se consideraron "significativamente diferentes", y sus valores de p se indican en el gráfico.

[0209]

Los resultados muestran que se observó una gran cantidad de células positivas para la tinción de 11A1 en la corteza cerebral de los ratones APPosk del grupo de control tratado con anticuerpo. Por otro lado, los grupos tratados con GPN18–2 y GPN06–1 mostraron una disminución estadísticamente significativa en las células positivas para la tinción de 11A1. La disminución fue estadísticamente significativa incluso en comparación con los grupos tratados con GPN18–5 y 1–5E. Estos resultados indican que el anticuerpo GPN18–2, que reconoce la región PMEL–CAF, y el anticuerpo GPN06–1, que reconoce la región PKD, tienen efectos medicinales más fuertes en la eliminación de oligómeros A β en el cerebro que el anticuerpo GPN18–5, que reconoce la región N–terminal, y el anticuerpo 1–5E, que reconoce el péptido vacunal en la región N–terminal.

Estos experimentos comparativos mostraron que los anticuerpos que reconocían las regiones PMEL–CAF y PKD eran más efectivos para eliminar los oligómeros A β en el

cerebro que los anticuerpos que reconocían la región N-terminal.

[0210]

[Ejemplo de referencia] Producción de nuevos ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer:

Se produjo un nuevo modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (ratones Tg2576/Tau264 (APP/Tau-Tg)) cruzando ratones Tg2576 (ratones transgénicos APP mutantes suecos), que exhiben placas amiloides, con ratones Tau264, que expresan tau humana (ratones de tipo salvaje).

[0211]

El análisis patológico en APP/Tau-Tg de 9 meses de edad mostró formación de placas amiloides detectadas por un anticuerpo anti-A β y acumulación de tau fosforilada detectada por un anticuerpo AT8. La aparición de microglía positiva para gpNMB también se confirmó mediante un anticuerpo anti-gpNMB (R & D, anticuerpo policlonal de cabra) y un anticuerpo Iba1, que detecta la microglía.

[0212]

[Ejemplo 13] Evaluación de la mejora de la función cognitiva por el anticuerpo anti-gpNMB en ratones del modelo de enfermedad de Alzheimer:

El modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratones APP/Tau-Tg de 14 meses de edad descrito en el Ejemplo de Referencia se usó para analizar el efecto de mejora de la función cognitiva del anticuerpo anti-gpNMB mediante la prueba del laberinto acuático de Morris. Los ratones no Tg de 14 meses de edad (ratones de tipo salvaje) nacidos de las mismas madres se utilizaron como controles para la comparación.

[0213]

<Configuración de grupos>

*Evaluación del grupo de anticuerpos 1: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-gpNMB GPN06-1, 2,5 mg/ml en tampón de NaCl 150 mM (pH 6,5) que contiene histidina 0,2 M (n = 8)

*Evaluación del grupo de anticuerpos 2: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-gpNMB GPN18-2, 2,5 mg/ml en tampón de NaCl 150 mM (pH 6,5) que contiene histidina 0,2 M (n = 8); el estudio se inició con n = 8, pero un animal abandonó antes de la prueba del laberinto acuático de Morris, por lo que los datos se obtuvieron de n = 7.

*Grupo de anticuerpos de control: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-BTV (Leinco Technologies, Inc.), 2,5 mg/ml en tampón de NaCl 150 mM (pH 6,5) que contiene histidina 0,2 M (n = 9); el estudio se inició con n = 9, pero un animal abandonó antes de la prueba del laberinto acuático de Morris, por lo que los datos se obtuvieron de n = 8.

*Grupo no Tg: Tampón de NaCl 150 mM (pH 6,5) que contiene histidina 0,2 M (n=12)

[0214]

<Prueba del laberinto acuático>

*Preparación: Una piscina negra con un diámetro interior de 100 cm y una altura de 45 cm se llenó con agua a 16 cm de profundidad. La temperatura del agua se ajustó a 21 a 23 °C, y el agua se mantuvo transparente e incolora. Después de cada día de prueba, se eliminaron las heces y se repusieron aproximadamente 10 litros de agua.

[0215]

*Prueba de adquisición: Se hundió una plataforma transparente de 15 cm de alto a 20 cm de la pared (30 cm del centro). La piscina se dividió en cuatro cuadrantes, incluida el área donde se hundió la plataforma, y los ratones se colocaron al azar solo en uno de los tres cuadrantes sin la plataforma. Cada prueba se limitó a 60 segundos y se realizó a una tasa de 5 pruebas/día, con un intervalo de aproximadamente 5 minutos entre pruebas. El tiempo de escape para llegar a la plataforma (tiempo de escape) se registró como datos. Los ratones que no escaparon en 60 segundos fueron guiados a la plataforma por un operador, y el tiempo de escape se registró en 60 segundos. Los ratones en la plataforma se retiraron de la piscina después de 10 segundos y se les permitió actuar libremente y secarse el cuerpo hasta el siguiente ensayo. Se utilizaron los segundos promedio de tiempo de escape de cinco ensayos para el rendimiento diario del ratón. Los ensayos se realizaron durante cuatro días.

[0216]

La prueba de adquisición finalizó cuando se estabilizó el rendimiento del grupo de control (No Tg), y se realizó una prueba de sonda al día siguiente.

*Prueba de sonda: El día después del último día de la prueba de adquisición, la plataforma se retiró de la piscina y una cámara de video capturó un nado libre de 60 segundos de cada ratón. Se midió el tiempo que el ratón que nadaba libremente pasó nadando en el cuadrante objetivo de los cuatro cuadrantes y se expresó como porcentaje del período de 60 segundos. Se realizó el mismo análisis para un nado hasta 30 segundos después de la entrada en la piscina.

[0217]

Las diferencias significativas para cada prueba se determinaron utilizando medidas repetidas y la prueba de diferencias significativas mínimas de Fisher (PLSD de Fisher), y las diferencias significativas para la prueba de sonda se determinaron utilizando la prueba de diferencias significativas mínimas de Fisher (PLSD de Fisher).

[0218]

Los resultados de la Prueba de Adquisición se muestran en el gráfico de la Figura 11. El análisis mostró que el grupo de anticuerpos de control para APP/Tau-Tg tenía una Latencia de Escape significativamente más larga en la prueba del laberinto acuático de Morris en comparación con el grupo No Tg (tipo salvaje). Por otro lado, el grupo APP/Tau-Tg que recibió el anticuerpo anti-gpNMB GPN06-1 o GPN18-2 mostró una reducción estadísticamente significativa en el tiempo para alcanzar la plataforma oculta. En el grupo APP/Tau-Tg tratado con el anticuerpo de control de isotipo (Leinco Technologies, Inc.), el tiempo para alcanzar la plataforma oculta fue el mismo que en el grupo tratado con medio.

[0219]

Los resultados de la prueba de sonda se muestran en el gráfico de la Figura 12. Los resultados de la prueba de sonda fueron similares a los de la prueba de adquisición. Específicamente, en el grupo APP/Tau-Tg tratado con el anticuerpo de control, los ratones pasaron estadísticamente significativamente menos tiempo nadando por el cuadrante donde se encontraba la plataforma oculta. Los ratones de los grupos tratados con GPN06-1 o GPN18-2 pasaron estadísticamente significativamente más tiempo nadando por el cuadrante donde se encontraba la plataforma oculta que el grupo tratado con anticuerpo de control.

[0220]

Estos resultados indican que los anticuerpos anti-gpNMB GPN06-1 y GPN18-2 restauran la función cognitiva en ratones APP/Tau-Tg con diferencias estadísticamente significativas.

[0221]

[Ejemplo 14] Diseño de humanización de anticuerpo anti-gpNMB de ratón:

Se analizó la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-gpNMB GPN06-1 para identificar sus regiones CDR, en vista de IMGT (Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, G. "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains". Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) PMID: 12477501 LIGM:268.) y numeración Kabat. Se usó el método combinado IMGT/Kabat para mantener óptima la estructura del bucle de CDR.

[0222]

<Diseño de humanización de cadena pesada>

El gen de línea germinal humana que más se aproximaba a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de ratón (VH0) (SEQ ID NO 283) era

IGHV1–46*01. Se usó la búsqueda BLAST para seleccionar 200 secuencias candidatas de IgG humana con alta homología con VH0. Luego, finalmente se seleccionaron cuatro secuencias marco en términos de homología de marco, retención de aminoácidos clave en el marco y estructura de bucle. Estas se sometieron a injertos de CDR para obtener así las secuencias mutantes humanizadas VH1, VH2, VH3 y VH4. Además, una secuencia diseñada a través del injerto de CDR de IGHV1–46*01 como marco se designó como secuencia mutante humanizada VH5. El alineamiento de estas secuencias mutantes humanizadas VH1 a VH5 con VH0 de ratón se muestra en la Figura 13, en la que las regiones CDR identificadas aparecen subrayadas. La Tabla 9 muestra la identidad y homología de estas secuencias mutantes humanizadas VH1 a VH5 con la secuencia de ratón VH0. El orden de identidad y homología de las secuencias mutantes humanizadas VH1 a VH5 con respecto a VH0 de ratón fue VH3=VH5>VH2>VH1>VH4.

[0223]

[Tabla 9]

Tabla 9: Identidad y homología de secuencias mutantes humanizadas VH1 a VH5 con la secuencia de ratón VH0

	Identidad de secuencia de aminoácidos	Homología de secuencia de aminoácidos
VH1	86,9%	92,6%
VH2	86,9%	94,3%
VH3	88,5%	93,4%
VH4	85,2%	92,6%
VH5	88,5%	93,4%

[0224]

<Diseño humanizado de cadena liviana>

El gen de línea germinal humana que más se aproxima a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de ratón (VL0) (SEQ ID NO 285) fue IGKV1–9*01. Se usó la búsqueda BLAST para seleccionar 200 secuencias candidatas de IgG humana con alta homología con VL0. Luego, finalmente se seleccionaron cuatro secuencias marco en términos de homología de marco, retención de aminoácidos clave en el marco y estructura de bucle. Estas se sometieron a injerto de CDR para obtener así las secuencias mutantes humanizadas VL1, VL2, VL3 y VL4. Además, una secuencia diseñada a través de injerto de CDR de IGHV1–9*01 como marco se designó como secuencia mutante humanizada VL5. El alineamiento de estas secuencias mutantes humanizadas VL1 a VL5 con VL0 de ratón se muestra en la Figura 14, en la que las

regiones CDR identificadas aparecen subrayadas. La Tabla 10 muestra la identidad y homología de estas secuencias mutantes humanizadas VL1 a VL5 con la secuencia de ratón VL0. El orden de identidad y homología de las secuencias mutantes humanizadas VL1 a VL5 con VL0 de ratón fue VL5>VL4>VL1>VL3>VL2.

[0225]

[Tabla 10]

Tabla 10: Identidad y homología de secuencias mutantes humanizadas VL1 a VL5 con la secuencia de ratón VL0

	Identidad de secuencia de aminoácidos	Homología de secuencia de aminoácidos
VL1	83,0%	92,5%
VL2	82,1%	90,6%
VL3	82,1%	91,5%
VL4	83,0%	93,4%
VL5	84,9%	93,4%

[0226]

[Ejemplo 15] Selección de anticuerpos humanizados

Las cinco secuencias de cadena pesada humanizadas y las cinco secuencias de cadena liviana humanizadas derivadas del anticuerpo anti-gpNMB GPN06-1 diseñado en el Ejemplo 14 se combinaron para preparar veinticinco anticuerpos humanizados. Se evaluó la unión de estos anticuerpos humanizados mediante ELISA de antígeno para seleccionar anticuerpos humanizados cuya actividad de unión era similar a la de los anticuerpos quiméricos humanos.

[0227]

Específicamente, se añadió una secuencia génica que codificaba una secuencia de señal al extremo 5' de cada una de las secuencias génicas que codificaban las cadenas H y las cadenas L de los anticuerpos anti-gpNMB humanizados diseñados en el Ejemplo 14, y la secuencia resultante se insertó en el vector de expresión de células animales pcDNA3.4 para formar un plásmido, que se expresó transitoriamente utilizando el Sistema de Expresión ExpiCHO (A29133, Thermo Fisher Scientific) para secretar anticuerpos en el medio. A continuación, el sobrenadante del cultivo se recogió y se purificó utilizando una columna de proteína A (Ab-Capture, Protenova) y una columna de filtración en gel (Superdex 200 Increase, Cytiva).

[0228]

El ELISA de antígeno se realizó añadiendo cada una de las soluciones diluidas en serie del anticuerpo humanizado purificado a una placa fijada con gpNMB soluble humana recombinante (secuencia nº 221). Los resultados se muestran en la Tabla 11. Los resultados mostraron que H1L1, H1L2, H2L1, H2L2, H3L1, H3L2, H4L1, H5L2, H5L4 y H5L5 tenían niveles similares de capacidad de unión (es decir, los valores de EC_{50} estaban dentro de 3 veces en comparación con el anticuerpo quimérico H0L0).

[0229]

[Tabla 11]

Nombre del anticuerpo	EC ₅₀ (M)	Actividad de unión relativa
H0L0	3.83E-10	1
H1L1	5.75E-10	0,92
H1L2	5.18E-10	0,88
H1L3	1.58E-09	0,83
H1L4	1.64E-09	0,86
H1L5	2.32E-09	0,81
H2L1	5.57E-10	0,91
H2L2	4.44E-10	0,89
H2L3	3.50E-09	0,68
H2L4	1.38E-09	0,82
H2L5	1.15E-09	0,79
H3L1	6.74E-10	0,85
H3L2	7.99E-10	0,85
H3L3	1.48E-09	0,7
H3L4	1.45E-09	0,69
H3L5	1.32E-08	0,68
H4L1	4.31E-10	0,87
H4L2	5.04E-09	0,71
H4L3	1.42E-08	0,37
H4L4	1.69E-08	0,49
H4L5	1.90E-09	0,57
H5L1	1.76E-09	0,65
H5L2	5.94E-10	0,84
H5L3	1.87E-09	0,7
H5L4	8.60E-10	0,77
H5L5	5.00E-10	0,78

[0230]

[Ejemplo 16] Análisis de interacción de los anticuerpos anti-gpNMB humanizados por el método de resonancia de plasmón superficial – 3:

Entre las variantes del anticuerpo GPN06 humanizado obtenidas en el Ejemplo 15,

se compararon H1L1, H1L2, H1L4, H2L1, H2L2, H3L1, H3L2, H4L1 y H5L2 en cuanto a las propiedades de unión (cinética de unión y disociación) a gpNMB humana por medio de resonancia de plasmón superficial (SPR). Específicamente, se usaron las mismas condiciones de medición y análisis que en el Ejemplo 7, excepto por las condiciones que se describen a continuación.

[0231]

Las variantes de anticuerpo GPN06 humanizado H0L0, H1L1, H1L2, H1L4, H2L1, H2L2, H3L1, H3L2, H4L1 y H5L2 se utilizaron como analitos. Cada analito en cada concentración se hizo reaccionar durante 600 segundos para obtener una curva de unión, y HBS-EP+ se hizo reaccionar durante 1200 segundos para obtener una curva de disociación. Una vez finalizada la reacción, el tampón de regeneración 1 (SDS 0,2%), tampón de regeneración 2 (100 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,5), 1 mol/L de NaCl, 15 mmol/L de MgCl₂) y tampón de regeneración 3 (10 mmol/L de glicina-HCl (pH 1,5)) se hicieron reaccionar durante 1 minuto cada uno para eliminar y lavar gpNMB-FLAG-His en el sistema de medición. La constante de velocidad de disociación (k_a , 1/Ms), la constante de velocidad de unión (k_d , 1/s) y la constante de disociación (K_D , M) se calcularon utilizando el software de evaluación BIACORE T200 (versión 2.0) con un modelo de unión 1:1. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

[0232]

[Tabla 12]

Tabla 12: Resultados del análisis de cinética por SPR de cada clon de anticuerpo anti-gpNMB contra gpNMB humana

Clon	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
H0L0	7.89E+05	2.09E-04	2.65E-10
H1L1	9.16E+05	5.67E-04	6.20E-10
H1L2	3.24E+06	8.08E-04	2.49E-10
H1L4	4.98E+05	2.13E-04	4.28E-10
H2L1	4.79E+05	3.30E-04	6.89E-10
H2L2	5.06E+05	3.54E-04	7.00E-10
H3L1	3.51E+06	1.54E-03	4.38E-10
H3L2	9.83E+05	6.36E-04	6.46E-10
H4L1	7.29E+05	4.15E-04	5.70E-10
H5L2	6.02E+05	3.54E-04	5.87E-10

[0233]

[Ejemplo 17] Identificación de aminoácidos en las regiones CDR en anticuerpos humanizados críticos para la unión por sustitución de alanina:

Cada aminoácido en las regiones CDR del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 producido en el Ejemplo 15 se sustituyó con alanina para producir cuarenta y ocho mutantes de sustitución de CDR del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1. La unión de estos anticuerpos sustituidos con alanina a gpNMB soluble humana recombinante (SEQ ID NO 221) se evaluó mediante ELISA de antígeno para determinar qué aminoácidos en las regiones CDR son críticos para la unión. Los mutantes de sustitución de CDR del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 y sus resultados de actividad de unión se muestran en las Tablas 13, 14-1 y 14-2 a continuación.

[0234]

Los resultados muestran que la sustitución con alanina de los siguientes aminoácidos en cada región CDR causó una actividad de unión reducida y, por lo tanto, son fundamentales para mantener la capacidad de unión: en la región variable de cadena liviana del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 31), en CDR-L1 (SEQ ID NO 23), isoleucina en la posición 29 y tirosina en la posición 31; en CDR-L2 (SEQ ID NO 25), treonina en la posición 50; y en CDR-L3 (SEQ ID NO 27), histidina en la posición 88, glutamina en la posición 89, triptófano en la posición 90, serina en la posición 92 y tirosina en la posición 93; y en la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-gpNMB humanizado H1L1 (SEQ ID NO 29), en CDR-H1 (SEQ ID NO 17), asparagina en la posición 32 y triptófano en la posición 33; en CDR-H2 (SEQ ID NO 19), ácido aspártico en la posición 55, fenilalanina en la posición 57 y treonina en la posición 58; y en CDR-H3 (SEQ ID NO 21), arginina en la posición 98, glicina en la posición 100 y glicina en la posición 109.

[0235]

[Tabla 13]

Tabla 13: Resultados de la evaluación de la actividad de unión de sustituciones de alanina en las regiones CDR de cadena liviana

	Posición de la sustitución de alanina	Aminoácido antes de la sustitución	EC ₅₀ (M)	Actividad de unión relativa
H1L1	—	—	1.98E−09	1,00
CDR−L1	27	S	1.56E−09	0,99
	28	S	1.27E−09	1,18
	29	I	2.30E−08	0,27
	30	S	8.63E−09	0,58
	31	Y	1.49E−08	0,36
CDR−L2	49	S	7.00E−10	0,79
	50	T	3.19E−09	0,30
	51	S	9.27E−10	0,82
CDR−L3	88	H	1.47E−07	0,08
	89	Q	2.75E−08	0,06
	90	W	1.22E−07	0,13
	91	N	1.84E−09	0,58
	92	S	1.86E−09	0,19
	93	Y	2.53E−08	0,00
	94	P	2.64E−08	0,05
	95	C	3.15E−09	0,45
	96	T	1.03E−09	0,83

[0236]

[Tabla 14−1]

Tabla 14–1: Resultados de la evaluación de la actividad de unión de sustituciones de alanina en las regiones CDR de cadena pesada

	Posición de la sustitución de alanina	Aminoácido antes de la sustitución	EC ₅₀ (M)	Actividad de unión relativa
H1L1	–	–	1.98E–09	1,00
CDR–H1	26	G	1.21E–09	1,08
	27	Y	6.99E–08	0,02
	28	T	1.98E–09	1,49
	29	F	4.80E–09	0,54
	30	T	2.02E–09	1,23
	31	D	5.15E–10	1,26
	32	N	7.83E–09	0,35
	33	W	2.81E–08	0,06
CDR–H2	51	I	9.93E–10	0,89
	52	D	2.79E–09	0,51
	53	P	8.01E–10	0,85
	54	S	6.52E–10	0,92
	55	D	3.15E–08	0,00
	56	S	4.29E–10	1,14
	57	F	3.25E–08	0,09
	58	T	2.80E–08	0,04

[Tabla 14–2]

Tabla 14–2: Resultados de la evaluación de la actividad de unión de sustituciones de alanina en las regiones CDR de cadena pesada

	Posición de la sustitución de alanina	Aminoácido antes de la sustitución	EC ₅₀ (M)	Actividad de unión relativa
H1L1	—	—	1.98E–09	1,00
CDR–H3	97	T	3.60E–10	0,98
	98	R	5.32E–08	0,05
	99	S	5.87E–10	0,92
	100	G	6.58E–08	0,06
	101	Y	5.02E–10	1,04
	102	Y	2.21E–09	0,68
	103	G	7.62E–10	1,14
	104	S	7.12E–10	0,88
	105	P	1.18E–09	1,09
	106	K	4.41E–10	1,00
	107	L	1.05E–09	0,71
	108	G	4.76E–10	0,96
	109	G	4.89E–09	0,34
	110	D	9.56E–10	0,79
	111	Y	5.84E–10	0,99

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0237]

La presente invención proporciona un anticuerpo anti–gpNMB que puede eliminar la microglía con mal funcionamiento y/o eliminar los oligómeros β amiloides, que son proteínas tóxicas, y/o restaurar el número de sinapsis y/o restaurar las funciones cognitivas, al unirse específicamente a la microglía de mamíferos que expresan gpNMB. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, para el tratamiento, la prevención o el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la microglía, como la enfermedad de Alzheimer.