

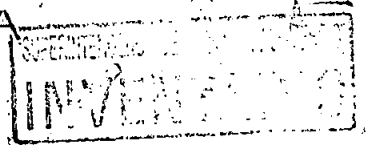
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT



CSA128547

SOLICITUD



Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

PATENTE DE INVENCION

10-68844

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO: "PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/18

71. SOLICITANTE : GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO: MIDDLESEX, INGLATERRA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

1-8 JUN 2010

(FORMA P 10).

7-10-
07-2010
Jo Esc

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068844- -00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:47:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYH Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 246

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **GLAXO GROUP LIMITED**

Dirección: Glaxo Wellcome House,
Berkeley Avenue, Greenford Middlesex
UB6 0NN, Inglaterra.

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex,
Inglaterra.

Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: ALARD, Philippe, Marc, Louis; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, Karen; GERMASCHEWSKI, Volker; LEWIS, Alan, Peter; SODEN, Peter Ernest; THOMAS, Pamela, Joan; WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth; CATCHPOLE, Ian, Richard y GOUGH, Gerald, Wayne.

Dirección: Algonomics NV, Technologiepark 4, B-9052 Gent y
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica y Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/067138

Fecha: 09/12/08

Publicación Internacional No. WO 2009/074583 A1

Fecha: 18/06/09

⑥

Título (54)

"PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/18

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB

11/12/07

0724185.4

GB

04/04/08

0806230.9

US

10/04/08

61/043,839

⑨

Comprobante de Pago No. 10-44,185

Fecha: 31 de Mayo de 2010

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación, Notificaciones de Adición de los Inventores GOUGH, Gerald, Wayne y CATCHPOLE, Ian Richard, Opinión Escrita y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068844- -00000-0000

Fecha: 2010-06-08 16:47:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 246

NIT : 800174089-2

CIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 44,185
CHA : MAYO 31 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	52817730	31/05/2010	52,812,000.00

***** CONCEPTO *****

VT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

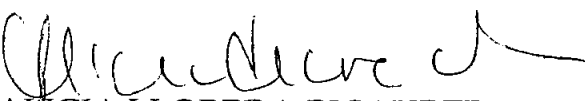
4: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

CIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado por Martin E Buchner

3. actuando como Notario Público

4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres

6. el 26 de agosto de 2004

7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth

8. Número G499865

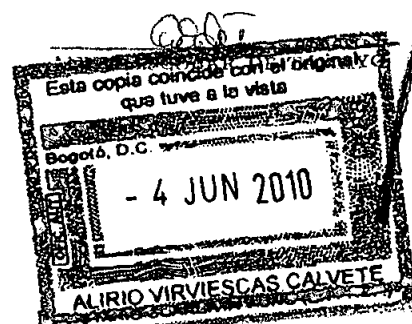
9. Sello/Estampilla

10. Firma: (ilegible)

Sello de la Oficina de Asuntos

M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

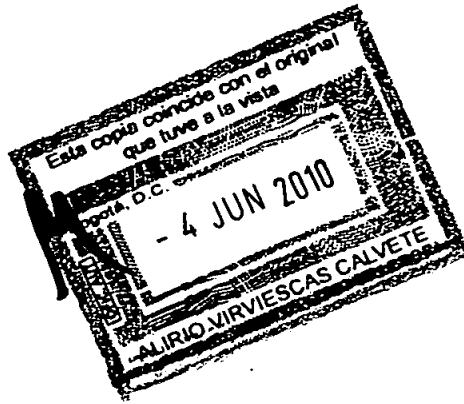
258650
Anta Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET -3 P 12:12

ues

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Exteriores y del Commonwealth

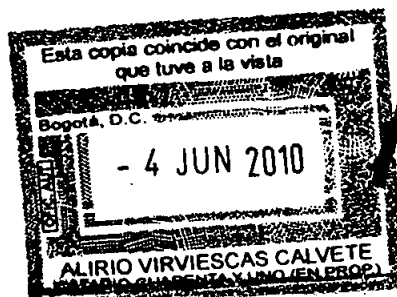
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **Martin Emil BUCHNER**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

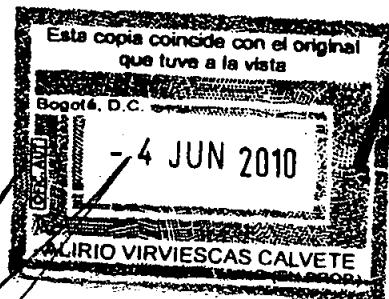
CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.



Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E Buchner**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs,
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth

8. Number/sous No **G499865**

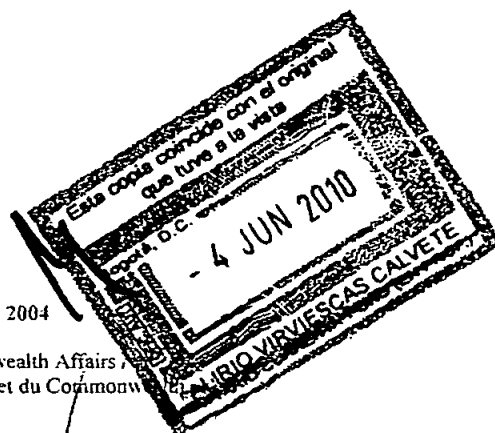
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **M. Monaghan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



Los abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales..

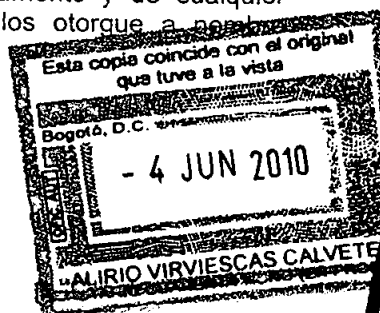
con domicilio en **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

domiciled at **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

23 AUG 2004

Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorized Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/18	
(22) Fecha de solicitud: 08-06-10		(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0724185.4	11-12-07	GB
	0806230.9	04-04-08	GB
	61/043.839	10-04-08	US
		(72) Inventor(es): ALARD, Philippe, Marc, Louis; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, Karen; GERMASCHEWSKI, Volker; LEWIS, Alan, Peter; SODEN, Peter Ernest; THOMAS, Pamela, Joan; WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth; CATCHPOLE, Ian, Richard y GOUGH, Gerald, Wayne.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 11-07-10		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 18-06-09
	Fecha de presentación de la solicitud: 09-12-08		N° publicación: WO 2009/074583 A1
	No. de solicitud: PCT/EP2008/067138		
54) Título:		PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β-amiloide que contiene los restos 28-35 de β-amiloide.

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 08-06-10

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18

(71) Solicitante(s): **GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es): ALARD, Philippe, Marc, Louis; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, Karen; GERMASCHESKI, Volker; LEWIS, Alan, Peter; SODEN, Peter Ernest; THOMAS, Pamela, Joan; WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth; CATCHPOLE, Ian, Richard y GOUGH, Gerald, Wayne.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0724185.4	11-12-07	GB
	0806230.9	04-04-08	GB
	61/043,839	10-04-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-07-10

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **18-06-09**

Fecha de presentación de la solicitud: 09-12-08

N° publicación: **WO 2009/074583 A1**

No. de solicitud: **PCT/EP2008/067138**

(54) Título: **PROTEINAS DE UNION A ANTIGENOS**

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 08-06-10

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18

(71) Solicitante(s): **GLAXO GROUP LIMITED**

(72) Inventor(es): ALARD, Philippe, Marc, Louis; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, Karen; GERMASCHESKI, Volker; LEWIS, Alan, Peter; SODEN, Peter Ernest; THOMAS, Pamela, Joan; WATTAM, Trevor, Anthony, Kenneth; CATCHPOLE, Ian, Richard y GOUGH, Gerald, Wayne.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0724185.4	11-12-07	GB
	0806230.9	04-04-08	GB
	61/043,839	10-04-08	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-07-10

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 09-12-08
No. de solicitud: **PCT/EP2008/067138**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **18-06-09**

No. Publicación : **WO 2009/074583 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título: **PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: GLAXOSMITHKLINE Attn. Reddish, Anna Corporate Intellectual Property (CN925 11) 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 01 JUN 2009		(PCT Rule 44.1)	
Applicant's or agent's file reference AXR/PB62764		Date of mailing (day/month/year) 29/05/2009	
International application No. PCT/EP2008/067138		International filing date (day/month/year) 09/12/2008	
Applicant GLAXO GROUP LIMITED			

- ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
Filing of amendments and statement under Article 19:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):
When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.
Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70
 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
 - ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
 - ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
- Reminders**
 Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.
 The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.
 Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.
 In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.
 See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sabina Maretto
--	--------------------------------------

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the International search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AXR/PB62764	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2008/067138	International filing date (day/month/year) 09/12/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11/12/2007
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b/s(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/067138

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/067138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ✓	WO 2004/071408 A (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION [US]; DAVIES JULIAN [US]; TANG YING [US];) 26 August 2004 (2004-08-26) example 1; table 3 -----	1,2, 29-31, 36,37
X ✓	WO 03/076455 A (UNIV RAMOT [IL]; SOLOMON BEKA [IL]; MCINNIS PATRICIA [US]) 18 September 2003 (2003-09-18) page 50, line 13 -----	1,2, 29-31, 36,37
P, X ✓	WO 2008/110885 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; LING CHIA-YANG [US]) 18 September 2008 (2008-09-18) page 86, line 10 ----- -/--	3,4, 29-31, 36,37, 49,50

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2009

Date of mailing of the international search report

29/05/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, Pierre

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/067138

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	✓ EP 0 683 234 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP]) 22 November 1995 (1995-11-22) table 1 -----	3, 4, 29-31, 36, 37, 49, 50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/067138

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004071408	A	26-08-2004	EP 1596809 A2	23-11-2005
WO 03076455	A	18-09-2003	AU 2003225636 A1	22-09-2003
			CA 2477675 A1	18-09-2003
			EP 1480666 A2	01-12-2004
			JP 2005532276 T	27-10-2005
			US 2006034855 A1	16-02-2006
			US 2007172484 A1	26-07-2007
WO 2008110885	A	18-09-2008	JP 2009062358 A	26-03-2009
			US 2009022728 A1	22-01-2009
EP 0683234	A	22-11-1995	AT 239797 T	15-05-2003
			DE 69432629 D1	12-06-2003
			DE 69432629 T2	25-03-2004
			WO 9417197 A1	04-08-1994
			US 5750349 A	12-05-1998

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 June 2009 (18.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/074583 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01)

Kenneth [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/067138

(74) Agents: REDDISH, Anna et al.; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, 980 Great West Road, Brentford Midd TW8 9GS (GB).

(22) International Filing Date:
9 December 2008 (09.12.2008)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0724185.4 11 December 2007 (11.12.2007) GB
0806230.9 4 April 2008 (04.04.2008) GB
61/043,839 10 April 2008 (10.04.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ALARD, Philippe, Marc, Louis [BE/BE]; Algonomics NV, Technologiepark 4, B-9052 Gent (BE). ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). FORD, Susannah, Karen [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). GER-MASCHEWSKI, Volker [DE/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). LEWIS, Alan, Peter [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). SODEN, Peter, Ernest [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire, SG1 2NY (GB). THOMAS, Pamela, Joan [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). WATTAM, Trevor, Anthony,

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(54) Title: ANTIGEN BINDING PROTEINS

(57) Abstract: Antigen binding proteins that bind β -amyloid peptide, in particular human β -amyloid peptide; methods of treating diseases or disorders characterised by elevated β -amyloid levels or β -amyloid deposits, particularly Alzheimer's disease and diseases or disorders affecting the eye or optic nerve characterised by elevated β -amyloid levels or β -amyloid deposits, including age related macular degeneration and glaucoma type diseases and β -amyloid dependent cataract formation, with said antigen binding proteins; pharmaceutical compositions comprising said antigen binding proteins; and methods of manufacture.

WO 2009/074583 A1

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year)

04 August 2009 (04.08.2009)

Applicant's or agent's file reference

AXR/PB62764

International application No.

PCT/EP2008/067138

To:

REDDISH, Anna
GlaxoSmithKline
Corporate Intellectual Property
980 Great West Road
Brentford Midd TW8 9GS
ROYAUME-UNI

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

09 December 2008 (09.12.2008)

The following indications appeared on record concerning:

the applicant

☐ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person

☐ the name☐ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

ATCHPOLE, Ian, Richard
GlaxoSmithKline
Uxbridge Wood Road
Uxbridge, Hertfordshire SG1 2NY
United Kingdom

State of Nationality

GB

State of Residence

GB

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and
inventor for all designated States.

A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Righetto Norbert

e-mail pt05.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 05

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/D5CHILLN0

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year)

04 August 2009 (04.08.2009)

Applicant's or agent's file reference

AXR/PB62764

International application No.

PCT/EP2008/067138

To:

REDDISH, Anna
GlaxoSmithKline
Corporate Intellectual Property
980 Great West Road
Brentford Midd TW8 9GS
ROYAUME-UNI

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

09 December 2008 (09.12.2008)

The following indications appeared on record concerning:

the applicant

☐

the inventor

☐

the agent

☐

the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person

☐

the name

☐

the address

☐

the nationality

☐

the residence

Name and Address

DUGH, Gerald, Wayne

GlaxoSmithKline

Hannels Wood Road

Stevenage

Hertfordshire SG1 2NY

United Kingdom

State of Nationality

GB

State of Residence

GB

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and
inventor for all designated States.

A copy of this notification has been sent to:

☒

the receiving Office

☐

the International Searching Authority

☐

the Authority(ies) specified for supplementary search

☐

the International Preliminary Examining Authority

☒

the designated Offices concerned

☐

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Righetto Norbert

e-mail pt05.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 05

Facsimile No. +41 22 338 89 75

1 PCT/IB/306 (January 2009)

1/D5CHLL0U0

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2008/067138

International filing date (day/month/year)
09.12.2008

Priority date (day/month/year)
11.12.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/18

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Vadot, Pierre Telephone No. +31 70 340-3968 
---	---	---

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2008/067138

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☒ complied with
 - ☐ not complied with for the following reasons:
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>5-28,32-35,38-48</u>
	No: Claims	<u>1-4,29-31,36,37,49,50</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-50</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-29,33,36-50</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

At this stage, the ISA decided not to invite to pay for further search fees but the Applicant should be aware that in case of EP filing, a non-unity objection might be raised based on the reasoning that raising further antibodies against region 28-33 of beta-amyloid does not involve inventive skills (see current inventive step objection) unless the Applicant is able to show another linking concept than the epitope of the antibodies. The application would be therefore splitted into the different antibodies claimed namely:

- invention 1: antibody as defined in claim 5 by the 6 CDRs (corresponding to the 6F6 murine antibody),
- inventions 2-16 : antibodies as defined as in claims 15-29 and claim 41 respectively. Even if, for instance, antibodies as defined in claims 16-19 share the same VL domain, the consequence is that the affinity is different (see results in table 17).
- invention 17 : antibodies as defined by claim 38, with the proviso that a major objection raised under Art. 5 and 6 PCT.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 2004/071408 A (APPLIED MOLECULAR EVOLUTION [US]; DAVIES JULIAN [US]; TANG YING [US];) 26 August 2004 (2004-08-26)
- D2: WO 03/076455 A (UNIV RAMOT [IL]; SOLOMON BEKA [IL]; MCINNIS PATRICIA [US]) 18 September 2003 (2003-09-18)
- D3: WO 2008/110885 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; LING CHIA-YANG [US]) 18 September 2008 (2008-09-18)
- D4: EP-A-0 683 234 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD [JP]) 22 November 1995 (1995-11-22)

Remark: the term "therapeutic" does not bring any technical details to the antibody and therefore has no relevance unless the Applicant has meant to further describe that the antibodies should bind to β -amyloid but also should reduce the amyloid load (as shown

in page 49, li 17).

5.1 Novelty (Art. 33(2) PCT)

Due to the wording of claims 1-2 ("...contains residues 28-35"...), every antibodies targeting a β -amyloid containing residues 28-35 fall under the scope of claims 1-2. Consequently, documents D1 and D2 are 2 novelty destroying documents. Document D1 discloses in example 1 the binding affinities of antibodies to β -amyloid 1-40. Table 3 gives the affinity values.

Document D2 discloses on page 50 the binding of antibodies to β -amyloid 1-42. The medical use is disclosed on page 52, § 141.

Claims 3-4 have been drafted in a more specific way since the antibodies must recognize an epitope that is within the region of residues 28-35 of β -amyloid. Document D4, in table 4 indicates antibodies binding to β -amyloid 25-35, therefore, falling into the scope of claims 3,4.

Regarding claim 5 and claims dependent thereon (pharmaceutical composition, method of treatment they are all new since none of the cited documents disclose the 6 CDR sequences as claimed in claim 5. Claims 5-14 are thus novel.

Claims 15-28,41-47 are also novel since the sequences of the variable regions are also novel.

Claims 29-31,36,37 are not novel since they depend on claims 1,2 which are not novel (see details of document D2).

On the contrary, claims 32-35 are new since they relate to the combination of the antigen binding protein with a complement pathway inhibitor.

Claims 38-40 are new as far as they relate to the bispecific antibody, but a major objection has to be raised under Art. 5 and 6 PCT (see Item VIII).

Claims 48 is consider as new since D4 does not disclose the epitope determination by

SPR.

Claims 49 and 50 are not novel with respect to the technical disclosure of D4.

5.2 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

Document D4 is considered as being the closest prior art.
The difference between D4 and the present application lies on different antibodies against β -amyloid.
The effect of the difference is the same as in the prior art.
The problem can therefore be defined as the provision of a further antibody binding to β -amyloid.
The solutions are defined in claim 5 but also in claims 15-28, 38 and 41 (see non-unity objection).
These solutions cannot be considered as being inventive since it seems particularly obvious to raise further antibodies against β -amyloid peptides.
Claims 1-50 are not inventive under Art. 33(3) PCT.

5.3 Claims 30-32,34,35 relate to a subject-matter considered by this Authority to be covered by the provision of Rule 39.1(iv)/67.1(iv) PCT.
The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for in a first or further medical treatment.

Re Item VI
Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 2008/110885	18.09.2008	06.03.2008	09.03.2007 03.03.2008

The patent document WO 2008/110885, cited as intermediate document on the ISR, was published on and claims a priority date of. At the national/regional phase, this document may become relevant to the question of novelty, depending on the validity of the priority date claimed by present application and on the relevant Patent.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

8.1 The claims relating to CDR sequences should indicate under which numerotation the sequences have been done. It seems that claim 5 is done under the Kabat numbering.

8.2 Claims 10,11,13 include different substitutions in the light and heavy chain framework regions. But support can be found only for certain combination of substitutions, and not for all kind of substitutions (see tables 7 and 8). A limitation should be done accordingly.

8.3 Regarding the medical use claims 30-32,34,35 and the result given on page 49, li 31, it is indicated that even if 6F6 was able to bind the beta-amyloid, it was not possible to warranty the medical benefit of these antibodies. Therefore, only the antibodies for which results are shown would have the possibility to claim a medical treatment.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS**RESUMEN –OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

Proteínas de unión a antígenos que se unen a péptido β -amiloide, en particular péptido β -amiloide humano; procedimientos de tratar enfermedades o trastornos que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, en particular enfermedad de Alzheimer y enfermedades o trastornos que afectan al ojo o al nervio óptico que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, que incluyen degeneración macular senil y enfermedades de tipo glaucoma y formación de cataratas dependiente de β -amiloide, con dichas proteínas de unión a antígenos; composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de unión a antígenos; y procedimientos de fabricación.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS

Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de unión a antígenos, incluidos los anticuerpos, que se unen al péptido β -amiloide y en particular a péptido β -amiloide humano. La presente invención también se refiere a procedimientos de tratar enfermedades o trastornos que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, en particular enfermedad de Alzheimer y enfermedades o trastornos que afectan al ojo o al nervio óptico que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados, que incluyen degeneración macular senil, enfermedades de tipo glaucoma y formación de cataratas dependiente de β -amiloide, con proteínas de unión a antígenos que se unen al péptido β -amiloide, en particular al péptido β -amiloide humano. Otros aspectos de la presente invención serán patentes a partir de la descripción siguiente.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más habitual de declive cognitivo senil, que afecta a más de 12 millones de personas en todo el mundo (Citron M (2002) Nat. Neurosci 5, Supl 1055-1057). Las etapas más tempranas de la enfermedad se caracterizan por una pérdida progresiva de la memoria con un declive cognitivo y deficiencias del habla y el comportamiento asociados. En las etapas más tardías de la enfermedad, los pacientes desarrollan amnesia global y presentan una función motora muy reducida. La muerte habitualmente se produce 9 años después del diagnóstico y a menudo

está asociada a otras afecciones, habitualmente neumonía (Davis K.L. y Samules S.C. (1998) en *Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders*, editores Enna S.J. y Coyle J.T. (McGraw-Hill, Nueva York páginas 267-316)). Los tratamientos actuales representan estrategias
5 sintomáticas, que se centran en aliviar la deficiencia cognitiva y mejorar los síntomas del comportamiento asociados a la etiología de la enfermedad en curso. En la práctica, estos tratamientos proporcionan únicamente un beneficio cognitivo de corta duración ya que se ha reseñado que el nivel de deficiencia cognitiva dura únicamente hasta 2 años. El potencial de una
10 terapia que modifique la enfermedad que ralentice y posiblemente detenga la progresión de la enfermedad es enorme. Dichas estrategias proporcionarían mejoras radicales y mantenidas en la calidad de vida de los pacientes y de forma muy importante sus cuidadores al igual que reduciría los tremendos costes sanitarios globales de esta enfermedad.

15

El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer actualmente se basa en una combinación de pruebas físicas y mentales que llevan al diagnóstico de una posible o probable enfermedad de Alzheimer aunque se están investigando biomarcadores de diagnóstico y de obtención de imágenes
20 (Sonnen y cols. (2007) *Expert Rev Neurotherapeutics* 7(8): 1021-1028; Lockhart y cols (2007) *Brain* 130: 2607-2615). Post mortem la enfermedad se confirma por marcadores neurológicos bien caracterizados en el cerebro, que incluyen el depósito de A β en placas parenquimáticas y en los vasos cerebrales, formación intraneuronal de ovillos neurofibrilares, pérdida de
25 sinapsis y pérdida de subpoblaciones neuronales en regiones específicas del

cerebro (Terry, RD (1991) J Neural Trans Supl 53: 141-145).

Una ingente cantidad de indicios genéticos, histológicos y funcionales sugieren que el péptido β -amiloide ($A\beta$) es clave en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, D. J. (2001) Physiological Reviews 81: 741-766) aunque
5 recientemente queda menos claro si los depósitos de $A\beta$ que se observan en el examen post mortem son la causa real del declive cognitivo (Ferreira ST (2007) Life 59(4-5): 332-345). Se sabe que $A\beta$ se produce mediante la escisión de la proteína precursora de β -amiloide (también conocida como APP)
10 mediante una enzima aspartil proteasa conocida como BACE1 (también conocida como β -secretasa, Asp2 o Memapsin-2) (De Strooper, B. y Konig, G. (1999) Nature 402: 471-472). Además de los depósitos parenquimáticos y vasculares, se ha planteado la hipótesis de que las formas oligoméricas solubles de $A\beta$ contribuyen al inicio de la EA y pueden afectar a la función
15 neuronal inicialmente al impedir la función sináptica (Lambert y cols (1998) Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A. 95 : 6448-6453; Kaye y cols (2003) Science 300:486-489; Cheng y cols (2007) J Biol Chem 282(33): 23818-23828; Ferreira y cols (2007) Life 59:332-345). Aunque las placas de amiloide insolubles se encuentran de forma temprana en la EA y en
20 la deficiencia cognitiva (MCI), los niveles de agregados de $A\beta$ soluble (algunas veces denominados oligómeros o ligandos con capacidad de difusión derivados de $A\beta$ (ADDL)) también están aumentados en estos individuos, y los niveles de $A\beta$ soluble presentan una mejor correlación directa con la degeneración neurofibrilar y con la pérdida de marcadores sinápticos que las
25 placas de amiloide (Naslund y cols (2000) J Am Med Assoc 283: 1571-1577,

Younkin, S. (2001) *Nat. Med.* 1: 8-19). Además, estos oligómeros pueden representar precursores de la vía de la formación fibrilar y su eliminación o neutralización puede evitar los efectos tóxicos y la formación fibrilar (Ferreira ST (2007) *Life* 59(4-5): 332-345; Gong Y (2003) *PNAS* 100:10417-10422). A pesar de estos hallazgos, la A β 42 muy amiloidógena y las formas truncadas en el extremo amino A β x-42 son las especies predominantes de A β que se encuentran tanto difusas como en las placas seniles (Iwatsubo, T (1994) *Neuron*. 13:45–53, Gravina, SA (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7013–7016) y los niveles relativos de A β 42 parecen ser no solo un biomarcador de EA sino también un regulador clave de la agregación de A β en la formación de placas de amiloide. Se ha demostrado que 42 se agrega más fácilmente que otras formas de A β *in vitro* (Jarrett, JT (1993) *Biochemistry* 32: 4693–4697) y por ello se ha implicado a la A β 42 como molécula de inicio en la patogénesis de la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92: 289–292). Aunque la A β 42 es habitualmente un producto minoritario en el metabolismo de APP, unas pequeñas variaciones en su producción están asociadas a unos efectos considerables sobre el depósito de A β y por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que la reducción de A β 42 por sí sola puede ser una forma eficaz de tratar la EA (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92: 289–292; Levites y cols (2007) *J Clin Invest.* 116(1): 193-201). En apoyo de esto, se ha reseñado que las mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP) y en los genes de presenilina aumentan predominantemente los niveles relativos de A β 42 y que por lo tanto acortan el tiempo hasta el inicio de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Selkoe D.J., Podlisny M.B. (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3: 67-99). Debería recalcarce sin embargo, que la velocidad de la deposición de

amiloide también depende de los niveles de amiloide globales, del catabolismo y de la eficacia del aclaramiento de A β del SNC que se ha demostrado que se ve influido negativamente por la edad y por niveles de amiloide elevados como los que se encuentran en la EA (Deane y cols (2005) J Neurosci 25(50):11495-11503; Wang y cols (2006) Drug Discovery Today 11(19/20): 931-938). En cuanto a esto, cada vez es más patente que el transporte del A β entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma desempeña un papel principal en la regulación de los niveles de amiloide en el cerebro (Shibata, y cols (2000) J Clin Invest 106 : 1489-1499), donde el A β se transporta rápidamente desde el SNC al plasma mediante mecanismos de transporte tales como LRP-1 y donde el A β se importa rápidamente desde el plasma al SNC mediante la unión a RAGE (Zlokovic BV (2004) J Neurochem 89: 807-811). Por lo tanto, se está desarrollando la vacunación activa con péptidos A β o la administración pasiva de anticuerpos específicos contra A β que se unen a A β periférico y que por lo tanto alteran el equilibrio dinámico entre el plasma, el CSF y el SNC. De hecho, actualmente hay numerosos estudios que han demostrado que ambas estrategias pueden disminuir los niveles de A β , reducir la patología por A β y en algunos casos proporcionar un beneficio cognitivo en diversos modelos transgénicos de amiloidosis. También se han realizado estudios limitados en especies superiores (Lemere, CA (2004) Am J Pathology 165: 283-297; Gandy, S (2004) Alzheimer Dis Assoc Disord 18: 44:46).

Se han generado modelos animales de depósitos amiloides que hiperexpresan transgenes humanos mutantes en ratones. Los ratones que hiperexpresan transgenes de APP humanos únicos habitualmente desarrollan depósitos de β -

amiloide de tipo placa cerebral a partir de los 12 meses de edad (Games D. y cols., (1995) *Nature* 373: 523-527; Hsiao K. y cols., (1996) *Science* 274: 99-102)), mientras que los ratones que portan los transgenes tanto de APP humana mutante como de presenilina-1 (PS-1) habitualmente desarrollan depósitos de β -amiloide de tipo placas cerebrales desde a partir de los 2 meses de edad (Kurt M.A. y cols., (2001) *Exp.Neurol.* 171: 59-71; McGowan E. y cols., (1999) *Neurobiol. Dis.* 6: 231-244). Estas considerables diferencias biológicas entre los diversos modelos de ratones transgénicos que se han usado han hecho que sea difícil comparar la farmacología y la eficacia de las diferentes estrategias. No existe un consenso real en la técnica sobre cómo funcionan realmente las inmunoterapias dirigidas contra β -amiloide y sus diversas formas. Es muy probable que los diferentes anticuerpos con diferentes propiedades de unión tengan resultados variables en esos modelos animales. También parece razonable que los anticuerpos pueden actuar mediante múltiples mecanismos y que los diferentes modos de acción que se han descrito no se excluyan los unos a los otros (Levites y cols (2007) *J Clin Invest.* 116(1): 193-201).

La primera inmunoterapia dirigida contra el amiloide cerebral en clínica fue Elan/Wyeth's AN-1792, una vacuna activa. Este tratamiento se terminó cuando se desarrollaron signos clínicos que eran coherentes con la meningoencefalitis. Los análisis de subgrupo sugirieron que el tratamiento ralentizaba el declive de la función cognitiva (*Nature Clin Pract Neurol* (2005) 1:84-85). Los análisis post-mortem de los pacientes también mostraron indicios de aclaramiento de placas (Gilman S. y cols, (2005) *Neurology* 64 (9) 1553-1562).

Actualmente se está desarrollando Bapineuzumab (AAB-001, Elan/Wyeth), un anticuerpo monoclonal pasivo.

- 5 Otras enfermedades o trastornos que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados incluyen deficiencia cognitiva leve (Kelley BJ (2007) *Neurologic Clinics* 25 (3), 577-609), hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis del tipo holandés, angiopatía β -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias neurodegenerativas, tales como las asociadas a la
- 10 enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer del tipo con cuerpos de Lewis (Mollenhauer B (2007) *J Neural Transm* publicada en internet el 23 de febrero de 2007, van Oijen, M *Lancet Neurol.* 2006 5:655-60), síndrome de Down (Mehta, PD (2007) *J Neurol Sci.* 254:22-7), degeneración macular senil (AMD)
- 15 (Johnson LV y cols (2002) *PNAS USA* 99: 11830-11835; Anderson DH y cols (2004) *Exp Eye Res* 78: 243-256), enfermedades de "tipo glaucoma" (Guo L y cols (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13444-13449) y formación de cataratas dependiente de $A\beta$ (Goldstein LE y cols (2003) *Lancet* 361: 1258-1265; Li G y cols (2003) *Mol Vision* 9: 179-183).

20

- La degeneración macular senil (AMD) es la causa principal de ceguera en el mundo desarrollado. Existen dos presentaciones clínicas principales de AMD. La AMD atrófica (seca) que se caracteriza por la degeneración del epitelio pigmentario retiniano (RPE) y la neuroretina. Las etapas más tempranas de la
- 25 AMD atrófica se asocian a la formación de drusen, bajo la capa celular del

RPE. La AMD atrófica temprana puede progresar hasta la etapa final de la enfermedad en la que el RPE degenera completamente y forma áreas claramente demarcadas de atrofia del RPE en la región de la macula: "atrofia geográfica". En esta forma de la enfermedad, la degeneración del RPE
5 provoca la muerte secundaria de los bastones y conos maculares y en estos casos, esto provoca una grave pérdida de visión senil. Una proporción de los pacientes de AMD desarrollan lo que puede considerarse una forma diferente o una complicación adicional de la enfermedad. Aproximadamente el 10-20% de los pacientes de AMD desarrollan neovascularización de las coroides,
10 (CNV). Cuando esto sucede, la forma de la enfermedad se conoce como "AMD húmeda" y esta puede asociarse con algunas de las pérdidas de visión más graves. En la AMD húmeda, crecen nuevos vasos de las coroides a través de roturas en la membrana de Bruch y proliferan hacia el interior y bajo el RPE y la neurorretina. En los casos habituales, se desarrolla la AMD en el ojo antes
15 de que se desarrolle la forma húmeda, sin embargo, en ocasiones poco frecuentes, la forma neovascular puede desarrollarse en ausencia de un anterior desarrollo de la forma atrófica. En ambas formas de la enfermedad, se produce una pérdida de visión debido a la muerte de las células fotorreceptoras, aunque en la AMD húmeda el sangrado interno de los vasos
20 permeables que se forman durante la CNV también provoca la pérdida de visión. En cuanto al tratamiento para la AMD se ha conseguido algún progreso en el desarrollo de tratamientos novedosos para paliar algunos de los aspectos de la AMD húmeda, en particular la reducción del sangrado de los vasos permeables provocados por la CNV mediante diversas moléculas que inhiben
25 o bien VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) o la ruta de la

señalización del receptor VEGF. Sin embargo, actualmente no hay ningún medio definitivo de tratamiento para la forma atrófica de AMD que es muy dominante ni para evitar la progresión de la AMD seca temprana o bien a una atrofia geográfica o bien a AMD húmeda, (Petrukhin K (2007) Expert Opin Ther Targets 11: 625-639)

Aunque los mecanismos exactos que provocan la producción de A β en RPE y el mecanismo o mecanismos exactos por los que actúa A β para influenciar la AMD no se comprenden completamente, los indicios implican que el aclaramiento del A β mediante agentes que se unen y que potencialmente neutralizan o solamente eliminan el A β pueden proporcionar una vía posible de aclarar el drusen en la AMD, reduciendo la activación de complemento en la AMD, reduciendo la atrofia del RPE y potencialmente reduciendo la inducción de la expresión de VEGF en el RPE y su localización en niveles elevados alrededor del drusen. Dicho tratamiento podría por lo tanto proporcionar medios de prevenir, retrasar, atenuar o invertir la pérdida de visión debido a la AMD y su progresión a atrofia geográfica y/o AMD exudativo. Esto puede lograr que el drusen contenga niveles menores de A β y/o A β local en el entorno que rodea el RPE y así interferir tanto en la etapa temprana como tardía de la AMD y tratar el declive celular subyacente que provoca la pérdida de visión.

Algunos datos publicados recientemente han arrojado luz sobre la interacción de las proteínas de complemento y amiloide beta en la generación de la AMD (Wang, J. y cols., (2008) J. Immunol. 181: 16651-6). Se ha demostrado que el

amiloide beta se une al factor de complemento I, el cofactor que con el factor H es responsable de la descomposición de la proteína de complemento I C3 a partir de la forma C3b produciendo su forma inactiva, iC3b, (Wang, J. y cols., 2008). Se sugirió que los resultados del estudio *in vitro* recientemente publicado apoyaban la hipótesis de que el amiloide beta activa el sistema de
5 complemento I del drusen bloqueando la función del factor de complemento I provocando una inflamación crónica de menor grado en los tejidos subretinianos; relacionando así cuatro de los factores asociados al desarrollo de la AMD: inflamación, activación de complemento, depósito de amiloide beta y drusen, (Wang, J. y cols., 2008). Anteriormente nunca se habían
10 documentado estos indicios directos del efecto de amiloide beta en la activación de la ruta de complemento alternativa puede potencialmente competir con el factor alternativo H por la unión al factor de complemento I, (Wang, J. y cols., 2008).

15

"Enfermedades de tipo glaucoma" es una expresión que se usa para un grupo de enfermedades que pueden provocar daños en el nervio óptico ocular y provocar ceguera. Es una causa principal de ceguera en el mundo provocada en último extremo por una presión intraocular aumentada (IOP) y una menor
20 agudeza visual. La relación entre la IOP y cómo esto provoca apoptosis de las células del ganglio retiniano (RGC) no se comprende bien. Una IOP elevada por sí sola puede inducir apoptosis (Cordeiro M F y cols (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101:13352-13356; Quigley H A y cols (1995) Invest Ophtalmol Visual Sci 36:774-786) pero no es en sí misma la única causa de muerte celular en
25 las neuronas ópticas. Además, se ha observado que la visión puede continuar

deteriorándose incluso tras la normalización de la IOP tras el tratamiento con agentes que reducen la presión ocular (Oliver JE y cols (2002) Am J Ophthalmol 133:764-772).

- 5 Recientemente se han publicado reseñas que relacionan los potenciales efectos citotóxicos del β -amiloide con la apoptosis de las RGC en el glaucoma (McKinnon SJ y cols (2002) Invest Ophthalmol Visual Sci 43:1077-1087). En los modelos animales de glaucoma se ha demostrado que la proteasa caspasa-3 está activada en las RGC lo que provoca un procesamiento anormal de la
- 10 proteína precursora amiloide (APP) mediante la caspasa-3 que genera fragmentos potencialmente tóxicos de APP que incluyen β -amiloide (McKinnon y cols (2002); Cheung ZH y cols (2004) Mol Cell Neurosci 25:383-393). Se ha demostrado que, entre otras células, las RGC expresan APP y esto por lo tanto parece ser una fuente plausible de β -amiloide. Tanto los niveles elevados de
- 15 APP y como los niveles de β -amiloide elevados se han relacionado con la activación de la caspasa-3 aunque esto se ha observado principalmente en los sistemas *in vitro*. No está claro si los niveles de APP en las RGC están también aumentados en el glaucoma contribuyendo así a la generación incluso de más β -amiloide en un mecanismo de retroalimentación positiva. Incluso
- 20 más recientemente, se ha sugerido la implicación de β -amiloide en la apoptosis de las RGC en un modelo de rata de glaucoma (Guo y cols (2007)). Se analizaron diversos agentes contra el β -amiloide o contra la producción de β -amiloide y se demostró una reducción de la muerte de las células del ganglio retiniano *in vivo* con un posible efecto potenciador cuando los tres tratamientos
- 25 se usaron juntos. El efecto mayor se observó al usar un anticuerpo contra β -

amiloide que casi fue equivalente al efecto observado con los tres agentes juntos.

Aunque los mecanismos exactos que provocan la producción de β -amiloide en las RGC y la relación con la IOP no se entienden completamente, los indicios implican que el aclaramiento β -amiloide mediante los agentes que se unen y potencialmente neutralizan o solamente eliminan el β -amiloide pueden proporcionar un vía posible de evitar la apoptosis de las RGC en el glaucoma y por lo tanto proporcionar un medio de retrasar, atenuar o invertir la pérdida de visión en el glaucoma. Esto puede lograr reducir los niveles de β -amiloide en las RGC y el entorno que las rodea y así paliar el declive celular subyacente que provoca la pérdida de visión.

-amiloide puede desempeñar un papel en otras enfermedades oculares y se ha asociado a la formación de cataratas supranucleares especialmente en las que se observan en pacientes de EA y los componentes de la vía de generación y procesamiento del A β están presentes en el cristalino (Goldstein LE, y cols., (2003); Li G, y cols., (2003)). Las estrategias terapéuticas que se describen para la intervención en la AMD y en las enfermedades de tipo glaucoma pueden por lo tanto aplicarse a la prevención de la formación de cataratas dependiente de A β .

El documento WO 2008/110885 se refiere a procedimientos de tratar enfermedades oftálmicas con inhibidores dirigidos contra el péptido β -amiloide. Específicamente, se describe el anticuerpo 6G que se une a un epítipo de A β 1-40 que parece incluir 25-34 y 40.

Sumario de la invención

En un aspecto de la presente invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide.

En una realización particular la proteína terapéutica de unión a antígenos reconoce un epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-34 de β -amiloide.

En una realización más particular la proteína terapéutica de unión a antígenos reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-33 de β -amiloide.

En otra realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que está dentro de la región de restos 28-35 de β -amiloide.

En otra realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que está constituido por los restos 28-33, 28-34 o 28-35 de β -amiloide.

En una realización de la invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos que requiere los restos 32 y 33 de β -amiloide para la unión.

En una realización de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo.

- 5 En una realización de la presente invención se proporciona una proteína terapéutica de unión a antígenos, que es una proteína de unión a antígenos, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo, que se une a péptido β -amiloide y que comprende las siguientes CDR:

- 10 CDRH1: VYYVH (SEC ID N.º: 1)
CDRH2: RIDPENGETIYTPKFQD (SEC ID N.º: 2)
CDRH3: SGY (SEC ID N.º: 3)

CDRL1: RSSKSLLHRNGITYLY (SEC ID N.º: 4)

- 15 CDRL2: QMSNLAS (SEC ID N.º: 5)
CDRL3: AQNLELWT (SEC ID N.º: 6)

- En otra realización de la invención se proporciona una proteína de unión a antígenos, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo
20 que se une específicamente a péptido β -amiloide y comprende CDR que son variantes de las secuencias que se describen anteriormente.

- Una variante de CDR incluye una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de la CDR mediante delección o sustitución de uno a varios
25 aminoácidos de la CDR, o mediante adición o inserción de uno a varios

aminoácidos en la CDR, o mediante una combinación de las mismas. La variante de CDR puede contener 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la CDR. La variante de CDR puede contener 1, 2 ó 3 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la CDR. Las sustituciones de los restos aminoacídicos pueden ser sustituciones conservadoras, por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por valina, o isoleucina.

10

Las proteínas de unión a antígenos que comprenden una variante de CDR tendrán unas propiedades funcionales iguales o similares a las que comprenden las CDR que se describen anteriormente. Por lo tanto, las proteínas de unión a antígenos que comprenden una variante de CDR se unirán a la misma proteína o epítipo diana con una afinidad de unión igual o similar a la CDR que se describe en el presente documento.

Un anticuerpo ejemplar es el anticuerpo monoclonal murino 6F6. En una realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo humanizado o quimérico que comprende las CDR de 6F6 anteriormente identificadas. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender las regiones variables del anticuerpo murino 6F6, en concreto la SEC ID N.º: 19 (V_H) y la SEC ID N.º: 21 (V_L). Un ejemplo de un anticuerpo humanizado basado en murino 6F6 es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene la SEC ID N.º: 28.

25

En toda esta memoria descriptiva, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat tal y como se describe en Kabat y cols.; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. Por lo tanto, a continuación se definen las CDR de acuerdo con la invención:

CDR: Restos

CDRH1: 31-35

10 CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-97

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

15

La IGHV1-24 (SEC ID N.º: 13) es una secuencia germinal humana que es una estructura receptora adecuada para injertar las CDR de V_H. En un aspecto particular, la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24. En realizaciones alternativas de la presente invención, la estructura receptora humana comprende una secuencia de la región variable de la cadena pesada humana que tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad entre las secuencias con la secuencia variable pesada de 6F6 murino en toda su longitud (excluyendo las secuencias de las CDR).

25 Para las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos, el término "idéntico" o

“identidad de las secuencias” indica el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o dos de ácidos nucleicos cuando están alineadas de forma óptima y se comparan con inserciones o deleciones apropiadas. De forma alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ADN se hibridan en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra.

La identidad porcentual entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas que comparten las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones por 100), tomando en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación entre las secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe más adelante.

La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP del paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y una ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de los restos PAM120, una deducción por la longitud del hueco de 12 y una deducción por hueco de 4. Además, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos

también puede determinarse usando el algoritmo de E. Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el program GAP del paquete de software GCG, usando o una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación del hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y una
5 ponderación de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

A modo de ejemplo, una secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a una secuencia de referencia tal como se describe, es decir ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero número de alteraciones de
10 nucleótidos comparada con la secuencia de referencia, tal como al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan a partir del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, que incluye transición y transversión, o inserción de nucleótidos, y en las que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones de los
15 extremos 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número de nucleótidos total de la
20 secuencia polinucleotídica de referencia por el porcentaje numérico de la identidad porcentual respectiva (dividido entre 100) y restando ese producto de dicho número de nucleótidos total de la secuencia polinucleotídica de referencia, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

25 en la que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total

de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia e y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,75 para 75%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,98 para 98%, 0,99 para 99% o 1,00 para 100%, $\cdot$ es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que
5 cualquier producto de x_n e y distinto de número entero se redondea al número entero inmediatamente inferior antes de restarlo de x_n .

De forma similar, una secuencia polipeptídica puede ser idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia tal como se describe en el presente
10 documento, que es 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia tal que el % de identidad sea inferior al 100%, tal como al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan a partir del grupo constituido por al menos una delección,
15 sustitución, que incluye sustitución conservadora y no conservadora, o inserción, de aminoácidos y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones de los extremos amino o carboxi de la secuencia de referencia polipeptídica o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas ya sea de forma individual entre los aminoácidos de la secuencia
20 de referencia o en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de los aminoácidos para un % de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos de la secuencia polipeptídica codificado por la secuencia polipeptídica de referencia tal como se describe en el presente documento por el porcentaje numérico de la
25 identidad porcentual respectiva (dividido entre 100) y después restando ese

producto de dicho número total de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número
5 total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia e y es 0,50
para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,75 para 75%, 0,80 para 80%, 0,85
para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,98 para 98%, 0,99 para 99% o
1,00 para 100%, $\cdot$ es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que
cualquier producto de x_a e y distinto de número entero se redondea al número
10 entero inmediatamente inferior antes de restarlo de x_a .

El % de identidad puede ser en toda la longitud de la secuencia.

Para construir una región V completa debe añadirse una estructura 4 al gen de
15 V IGHV1-24 codificado por la línea germinal. Las secuencias 4 estructurales
incluyen las codificadas por el minigen JH4 humano (Kabat):

YFDYWGGTLVTVSS (SEC ID N.º: 15)

20 La persona experta apreciará que un gen V y un gen J germinales no incluyen
la secuencia codificante para toda la CDR3 de la cadena pesada. Sin
embargo, en los anticuerpos de la invención, la CDR3 de la cadena pesada
completa la proporciona la inmunoglobulina donante. Por consiguiente, la
combinación de un gen de VH tal como IGHV1-24, un minigen de JH tal como
25 JH4, y un conjunto de CDR de la cadena pesada, tal como las SEC ID N.º: 1,

SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 3 (ensambladas de forma que imiten la región variable de la cadena pesada madura y completamente reordenada) es suficiente para definir una región variable de la cadena pesada de la invención.

- 5 La IGKV2-28 (SEC ID N.º: 16) es una secuencia germinal humana que es una estructura receptora adecuada para injertar las CDR de V_L . En un aspecto particular, la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28. En realizaciones alternativas de la presente invención, la estructura receptora humana comprende una secuencia de la región variable de la
- 10 cadena ligera humana que tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad entre las secuencias con la secuencia variable ligera de 6F6 murino en toda su longitud (excluyendo las secuencias de las CDR).

- Para construir una región V completa debe añadirse una estructura 4 al gen de
- 15 V IGKV2-28 codificado por la línea germinal. Las secuencias 4 estructurales incluyen las codificadas por el minigen JK-1 humano (Kabat):

WTFGQGTKVEIK (SEC ID N.º: 18)

- 20 La persona experta apreciará que un gen V y un gen J germinales no incluyen la secuencia codificante para toda la CDR3 de la cadena ligera. Sin embargo, en los anticuerpos de la invención, la secuencia de la CDR3 la proporciona la inmunoglobulina donante. Los dos primeros restos de los restos del minigen JK-1 entran dentro de la región de la CDR3. Para el minigen JK-1, estos restos
- 25 son idénticos a los dos últimos restos de la CDRL3 de la cadena ligera (SEC

ID N.º: 6). Por consiguiente, la combinación de un gen de V_L tal como IGKV2-28, una FR4 tal como JK-1, y un conjunto de CDR de cadena ligera, tal como las SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5 y SEC ID N.º: 6 (ensambladas de forma que imiten la región variable de la cadena ligera madura y completamente reordenada) es suficiente para definir una región variable de la cadena ligera de la invención.

En una realización particular de la invención, la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24 y del minigen JH4 y la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28 y del minigen JK-1 que opcionalmente contiene una o más sustituciones de restos aminoacídicos basándose en los restos correspondientes que se encuentran en el dominio V_H del donante que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 y el dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 21 que mantiene toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo donante por el péptido β -amiloide. Por 'sustancialmente toda la afinidad de unión' se quiere decir que el anticuerpo terapéutico presenta como máximo cinco veces, de forma más particular dos veces, una reducción en la afinidad de unión comparada con la del anticuerpo donante.

20

En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena pesada receptora humana derivada de IGHV1-24 y JH4 tiene una o más, tal como de una a quince, de forma más particular de dos a quince, sustituciones de restos aminoacídicos que se seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

25

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
1	Q	E
5	V	Q
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
41	P	T
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
75	T	S
76	D	N
93	A	V
94	T	S

En una realización más particular la estructura de la cadena pesada receptora humana que se deriva de IGHV1-24 y JH4 comprende los siguientes restos (o un sustituto conservador de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24)	Sustitución del resto
----------------------------	--	-----------------------

	donante)	
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
93	A	V
94	T	S

En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena ligera receptora humana que se deriva de IGKV2-28 y JK-1 tiene una o más, tal como de una a cuatro, de forma más particular dos, sustituciones de restos aminoacídicos que se seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
8	P	A
11	L	N
43	S	P
63	S	T
64	G	S
100	Q (JK-1)	G

104	V (JK-1)	L
-----	----------	---

En una realización más particular de la invención la estructura de la cadena ligera receptora humana que se deriva de IGKV2-28 y JK-1 comprende los siguientes restos (o un sustituto conservador de los mismos):

5

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
11	L	N
64	G	S

En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 24.

10

En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 26.

15

En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 24 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 26.

20

En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico

que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.

- 5 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 10 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 15 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 20 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.
- 25 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico

que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.

- 5 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.
- 10 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.
- 15 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.
- 20 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.
- 25 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico

que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.

- 5 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.
- 10 La región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede tener al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una cualquiera de las SEC ID N.º: 24, 59, 61, 63, ó 65. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede tener al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una cualquiera de las SEC ID N.º: 26, 67, 69, ó 71.
- 15 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico, anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 27.
- 20 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico, anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28.
- En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico,
- 25 anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se

expone en la SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28.

- 5 Cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada puede combinarse con una región constante humana adecuada. Cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera puede combinarse con una región constante adecuada.
- 10 En una realización particular la proteína terapéutica de unión a antígenos de la presente invención es un anticuerpo o fragmento y/o derivado del mismo que esencialmente carece de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- 15 En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica de unión a antígenos o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

- En un aspecto adicional de la invención se proporciona un procedimiento de
- 20 tratar a paciente humano que padece una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide procedimiento que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína terapéutica de unión a antígenos o anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

25

En una realización de la invención la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide es la enfermedad de Alzheimer. En otra realización de la invención la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide es una enfermedad o trastorno que afecta al ojo o al nervio óptico que se caracteriza por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados. Específicamente, la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide puede ser degeneración macular senil (AMD), glaucoma o formación de cataratas dependiente de β -amiloide.

En otra realización de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos se administra combinada con un inhibidor de la vía de complemento, especialmente la vía de complemento alternativa, por ejemplo, pero sin exclusión otras estrategias contra complemento: factor de complemento H (CFH) o fragmentos del mismo, Receptor 1 de complemento soluble, (sCR1) o fragmentos del mismo, proteína cofactor de membrana soluble (MCP) y fragmentos del mismo, factor acelerador de la descomposición soluble (DAF) y fragmentos del mismo. En este contexto, un inhibidor de la vía de complemento es una molécula que actúa regulando negativamente la actividad de una vía de complemento, especialmente la vía de complemento alternativa.

En una realización adicional de la invención, la proteína terapéutica de unión a antígenos se administra combinada con un inhibidor de un activador de la vía de complemento, especialmente un inhibidor de un activador de la vía de complemento alternativa, por ejemplo, pero sin excluir otras estrategias de inhibición u otras dianas de la vía de complemento: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo de dominio, para neutralizar la

actividad del factor de complemento D (CFD) o del factor de complemento B (CFB). El inhibidor peptídico de 13 restos del componente C3 del complemento, compstatina, y el anticuerpo contra el componente C5a del complemento, pexelizumab, también se considera que son inhibidores de los
5 activadores de la vía de complemento en el contexto de la invención. En general, un inhibidor de un activador de la vía de complemento es un agente que inhibe o actúa de agonista, en algún grado, de una actividad biológica de un activador de complemento dado, de tal forma que el efecto sería regular negativamente la actividad de una vía de complemento, especialmente la vía
10 de complemento alternativa.

Recientemente se han revisado estrategias terapéuticas que tienen como diana el complemento (Ricklin, D & Lambris, J. (2007) Nature Biotechnology 25: 1265-75, que se incorpora al presente documento por referencia en su
15 totalidad) y las estrategias contra la vía de complemento que se describen en él podrían usarse todas potencialmente combinadas con un anticuerpo contra β -amiloide para proporcionar una estrategia terapéutica. Las estrategias contra complemento que se consideran incluyen: (i) inhibidores de proteasas, por ejemplo inhibidores de factor de complemento D, (ii) reguladores de
20 complemento solubles, por ejemplo el receptor 1 de complemento soluble truncado, (iii) anticuerpos terapéuticos, por ejemplo contra el factor de complemento D o B, (iv) inhibidores de componentes de complemento, por ejemplo inhibidor de C5, y (v) antagonistas de los receptores, por ejemplo antagonistas del receptor C5a de molécula pequeña.

25

El inhibidor de la vía de complemento, o el inhibidor de un activador de la vía de complemento, puede administrarse de forma simultánea con la proteína terapéutica de unión a antígenos de la invención, o de forma secuencial, separada o de forma escalonada.

5

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica de unión a antígenos tal como se define en el presente documento y un inhibidor de la vía de complemento o un inhibidor de un activador de la vía de complemento.

10

También se proporciona el uso de una proteína terapéutica de unión a antígenos o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide.

15

También se proporciona un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo que tiene una primera especificidad por β -amiloide, tal como un epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal como se describe anteriormente, y una segunda especificidad por un activador

20

de la vía de complemento.

También se proporciona una proteína de unión a antígenos de la invención, un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo de la invención, para usar en el tratamiento de una

25

enfermedad relacionada con péptido β -amiloide.

En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_H murino que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 y un dominio V_L murino que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 21.

En otra realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de la SEC ID N.º: 19, en particular el polinucleótido de la SEC ID N.º: 20.

En otra realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_L que tiene la secuencia de la SEC ID N.º: 21, en particular el polinucleótido de la SEC ID N.º: 22.

En un aspecto de la presente invención se proporciona una proteína de unión a antígenos que compite con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28 para unirse a β -amiloide en un ensayo ELISA.

La persona experta en la técnica aprecia que para que una proteína de unión a antígenos (proteína A de unión a antígenos) compita con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la

SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28 (anticuerpo B) por un sitio de unión específico (β -amiloide), la proteína A de unión a antígenos debe estar presente en una cantidad suficiente como para que tenga un efecto en dicho ensayo. En una realización particular, proteína A de unión a antígenos y el anticuerpo B están presentes en cantidades equimolares. En otra realización, la presencia de proteína A de unión a antígenos reduce la unión de del anticuerpo B a β -amiloide en un ensayo ELISA en más de 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. En otra realización β -amiloide está unido a una placa de inmunoensayo en un ensayo ELISA. En otra realización la proteína A de unión a antígenos reduce la unión del anticuerpo B a β -amiloide unido a la placa, mientras que un control no específico contra β -amiloide no se une.

En un aspecto adicional de la invención la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo terapéutico que comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden polipéptidos que son al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º: 27 y SEC ID N.º: 28, respectivamente, en las que dicho anticuerpo se une a β -amiloide. En una realización preferida, el anticuerpo reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una proteína de unión a antígenos que se une a un péptido β -amiloide biotinilado en el extremo C que comprende los restos 24-35 (SEC ID N.º: 10) o 28-39 (SEC ID N.º: 11) de β -amiloide según se determina mediante resonancia de plasmón superficial,

estando dicho péptido unido a un chip sensor de estreptavidina.

- En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una proteína de unión a antígenos, específicamente un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, que se une específicamente a β -amiloide y requiere al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide para su unión. En una realización preferida, la proteína de unión a antígenos además requiere al menos un resto que flanquea o un resto estructuralmente próximo a dicho al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide para su unión. Por consiguiente, la proteína de unión a antígenos puede requerir independientemente uno, dos, tres, cuatro, cinco o más restos que se seleccionan a partir del grupo constituido por 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 de β -amiloide, y restos flanqueantes o estructuralmente próximos.
- La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente dichas proteínas de unión a antígenos usando, por ejemplo, barrido de sustitución con alaninas en ensayos ELISA. Sobre esto, si la proteína de unión a antígenos requiere o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide, o un resto flanqueante o estructuralmente próximo para su unión puede determinarse sustituyendo independientemente dicho resto de β -amiloide con alanina y comparando la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos con el péptido β -amiloide sustituido con alaninas con la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos del β -amiloide de tipo silvestre. Si es necesario o no un resto en la región 28-35 de β -amiloide se define por una reducción en la afinidad de unión de la proteína A de unión a antígenos al péptido β -amiloide

sustituido con alaninas comparada con la del péptido β -amiloide de tipo silvestre, en la que dicha reducción es superior a 1, 2, 3, 4 ó 5 veces según se determina mediante mediciones de afinidad en Biacore o ELISA.

- 5 Además, un resto estructuralmente próximo en este contexto es un resto que está cercano en el espacio tridimensional al resto en cuestión y que se une a la proteína de unión a antígenos. La persona experta en la técnica aprecia que los epítomos de los antígenos pueden ser secuencias peptídicas o lineales o no lineales. En este último, el caso no lineal, aunque los restos son de regiones
- 10 diferentes de la cadena peptídica, pueden estar cercanos en la estructura tridimensional del antígeno. Dichos restos estructuralmente próximos pueden determinarse a través de programas de modelos por ordenador o mediante estructuras tridimensionales obtenidas mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como cristalografía por rayos X.

15

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, procedimiento que comprende expresar un polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula huésped.

- 20 En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 24.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica

- 25 una cadena ligera de anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_L que

tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 26.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia que se
5 expone en la SEC ID N.º: 27.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia que se
10 expone en la SEC ID N.º: 28.

En una realización más particular de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico, polinucleótido que comprende la secuencia que se expone en la SEC ID N.º:
15 29.

En otra realización más particular de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico, polinucleótido que comprende la secuencia que se expone en la SEC ID N.º:
20 30.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una detección por transferencia Western de diversas formas de beta amiloide usando el anticuerpo 6F6 o 6E10 (anticuerpo específico para A β 1-16 humano; reactivo comercial, Eurogentec) y 5G5
25 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo propio).

La Figura 2 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en área % de placas
5 corticales en términos de media $\pm$ error típico de la media.

La Figura 3 muestra gráficos de barras que muestran la carga de placas en cortes de córtex e hipocampo de ratones transgénicos para hAPP después del tratamiento con 17 mg/kg o 33 mg/kg de 6F6 expresada en número de placas
10 por mm² en términos de media $\pm$ error típico de la media.

La Figura 4 muestra la detección de amiloide beta en la retina de ratones cfh^{-/-} viejos

15 La Figura 5 muestra la reactividad cruzada de 6F6 con amiloide beta en la retina de ratones cfh^{-/-} viejos

Descripción detallada de la invención

1. Proteínas de unión a antígenos

20 El término "proteína de unión a antígenos" tal como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otras construcciones de proteínas, tal como dominios, específicamente los que son capaces de unirse a β -amiloide, tal como se describe más adelante.

1.1 Anticuerpos intactos

25 Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser

“anticuerpos intactos”. Una proteína de unión a antígenos de la invención incluye un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo. Los anticuerpos intactos son habitualmente glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos ligeras. Excepto las IgM, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150KDa, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Habitualmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente mientras que el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina varia. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y un región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos denominados Kappa y Lambda basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden dividirse en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. La IgG y la IgA pueden subdividirse a su vez en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4; e IgA1 y IgA2. Existen variantes de especies donde el ratón y la rata tienen al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere

especificidad de unión al anticuerpo, donde ciertas regiones presentan una variabilidad particular denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de la región variable se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas muy próximas mediante las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión de antígenos de anticuerpos. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero muestran diversas funciones efectoras tales como participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediante la unión al receptor $Fc\gamma$, semivida/tasa de aclaramiento mediante el receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente de complemento mediante el componente C1q de la cascada de complemento.

Se ha reseñado que la región constante de IgG2 humana carece esencialmente de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se ha reseñado que la región constante de IgG4 humana carece de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica y actúa de mediadora en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos únicamente de forma débil. Los anticuerpos que carecen esencialmente de estas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

1.1.1 Anticuerpos humanos

Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser

"anticuerpos humanos". Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante un número de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante el procedimiento de los hibridomas usando líneas celulares de mieloma humanas o de heteromieloma de ratón y humana véase Kozbor J. *Immunol* 133, 3001, 5 (1984) y Brodeur, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de colecciones de fagos o ratones transgénicos ambos de los cuales utilizan repertorios de regiones V humanas (véase Winter 10 G, (1994), *Annu. Rev. Immunol* 12,433-455, Green LL (1999), *J. Immunol. methods* 231, 11-23).

Actualmente se dispone de diversas cepas de ratones transgénicos en las que sus locus de inmunoglobulina murinos se han reemplazados por segmentos 15 génicos de inmunoglobulina (véase Tomizuka K, (2000) *PNAS* 97,722-727; Fishwild D.M (1996) *Nature Biotechnol.* 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, *Nature Genetics*, 15,146-156). Tras la exposición a antígenos dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos de los que pueden seleccionarse anticuerpos de interés.

20 Particularmente interesante es el sistema de TrimerTM (véase Eren R y cols, (1998) *Immunology* 93:154-161) en el que los linfocitos humanos se transplantan en ratones radiados, el sistema de anticuerpos linfocíticos seleccionado (SLAM, véase Babcook y cols, *PNAS* (1996) 93:7843-7848) en el 25 que los linfocitos humanos (o de otras especies) se introducen en un

procedimiento de generación masiva conjunta de anticuerpos *in vitro* seguida de separación, dilución limitante y procedimiento de selección y el Xenomouse II™ (Abgenix Inc). Hay una estrategia alternativa disponible en Morphotek Inc que usa la tecnología del Morphodoma™.

5

La tecnología de presentación en fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos (y fragmentos del mismo), véase McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) y Griffiths EA y cols (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo con esta técnica se clonan los genes del dominio V del anticuerpo en marco o bien con un gen de proteínas de la cubierta o principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd y se presenta (habitualmente con la ayuda de un fago cooperador) como fragmento funcional de anticuerpos sobre la superficie de la partícula del fago. Las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo consiguen la selección del gen que

10

codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. La técnica de presentación en fagos puede usarse para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno de colecciones formadas por linfocitos B humanos extraídos de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o de forma alternativa de donantes humanos no inmunizados (véase Marks;

15

J.Mol.Biol. 222, 581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprenda un dominio Fc es necesario reclonar el fragmento derivado del fago presentado en un vector de expresión mamífero que comprenda las regiones constantes deseadas y que establezca líneas celulares con expresión estable.

20

25

La técnica de la maduración por afinidad puede usarse para mejorar la afinidad de unión. Esto puede lograrse por ejemplo por sustitución secuencial de las regiones H y L de la cadena V con variantes naturales y seleccionando en base a las afinidades de unión mejoradas (Marks; Bio/technol 10, 779-783
5 (1992). Actualmente también hay disponibles variantes de esta técnica tales como "sellado de epitopos" (documento WO 93/06213, Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993)). Más recientemente se han obtenido anticuerpos madurados por afinidad mediante mutagénesis aleatoria de las regiones V o las CDR por ejemplo usando replicasas de ARN con tendencia a
10 errores y la posterior selección de estas colecciones mediante técnicas de selección de presentación en ribosomas (Kopsidas G BMC Biotechnology. 7: 18, 2007).

1.1.2 Anticuerpos quiméricos y humanizados

15 Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser anticuerpos "quiméricos" o "humanizados". El uso de anticuerpos intactos no humanos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos comporta los actualmente bien establecidos problemas de la potencial capacidad inmunógena especialmente tras la administración repetida del anticuerpo: es
20 decir, el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como foráneo y desencadenar una respuesta neutralizadora. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase en lo que antecede) se han desarrollado diversas técnicas en el transcurso de los años para superar estos problemas y generalmente conllevan reducir la composición
25 de las secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico

humano a la vez que se mantiene la facilidad relativa de obtener anticuerpos no humanos de un animal inmunizado por ejemplo ratón, rata o conejo. En líneas generales, se han usado dos estrategias para lograr esto. La primera son los anticuerpo quiméricos, que generalmente comprenden un dominio
5 variable no humano (por ejemplo de roedor tal como de ratón) fusionado a una región constante humana. Debido a que el sitio de unión de antígenos de un anticuerpo está localizado en las regiones variables, el anticuerpo quimérico mantiene su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por lo tanto es capaz de realizar
10 funciones efectoras tal como se describe más arriba. Los anticuerpos quiméricos habitualmente se producen usando procedimientos de recombinación de ADN. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo ADNc) se aísla y secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse
15 específicamente a genes que codifican las regiones variables de las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADN de las SEC ID N.º: 19 y 21 que se describen anteriormente). Las células de hibridoma sirven de fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se introduce en vectores de expresión que después se transfectan a células hospedadoras tales como
20 *E. Coli*, células COS, células CHO, células PerC6 o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulínica obteniendo la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante de las cadenas L y H humanas por las correspondientes regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo murinas), véase por ejemplo Morrison; PNAS 81,
25 6851 (1984). Así, en otra realización de la invención se proporciona un

anticuerpo quimérico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 21 fusionada a una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG por ejemplo IgG1) .

5

La segunda estrategia conlleva la generación de anticuerpos humanizados en los que se reduce el contenido no humano del anticuerpo al humanizar las regiones variables. Dos técnicas de humanización han ganado popularidad. La primera es la humanización mediante injerto de CDR. Las CDR forman
10 bucles cerca del extremo N del anticuerpo donde forman una superficie montada en un supercántigo que proporcionan las regiones estructurales. La especificidad de unión al antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de la superficie de sus CDR. Estas características a su vez son determinadas por la conformación de las
15 CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR, y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los restos que comprenden las CDR. Puede lograrse un gran descenso de la capacidad inmunógena injertando sólo las CDR de un anticuerpo no humano (por ejemplo murino) (anticuerpo "donante") sobre una estructura humana adecuada ("estructura receptora") y
20 regiones constantes (véase Jones y cols (1986) Nature 321,522-525 y Verhoeyen M y cols (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR *per se* puede no conseguir que se mantengan todas las propiedades de unión de antígenos y con frecuencia se encuentra que deben preservarse algunos restos estructurales del anticuerpo donante (que algunas veces se
25 denominan "contramutaciones") en la molécula humanizada si debe

- recuperarse una afinidad de unión de antígenos significativa en la molécula humanizada (véase Queen C y cols (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M y cols (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, pueden elegirse regiones V humanas que muestran la mayor homología entre las secuencias
- 5 (habitualmente 60% o mayor) para el anticuerpo donante no humano a partir de una base de datos para proporcionar la estructura humana (FR). La selección de FR humanas puede realizarse o bien a partir de consensos humanos o a partir de anticuerpos humanos individuales. Cuando sea necesario, los restos clave del anticuerpo donante se introducen en la
- 10 estructura receptora humana para conservar las conformaciones de las CDR. Pueden usarse los modelos por ordenador del anticuerpo para ayudar a identificar dichos restos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.
- 15 De forma alternativa, la humanización puede lograrse mediante un procedimiento de "chapado". Un análisis estadístico de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas y murinas reveló que los patrones precisos de los restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones superficiales
- 20 individuales tienen una gran preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan E.A. y cols; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 y Pedersen J.T. y cols (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973). Por lo tanto es posible reducir la capacidad inmunógena de un Fv no humano sustituyendo los restos expuestos de sus regiones estructurales que difieren de las que habitualmente
- 25 se encuentran en los anticuerpos humanos. Debido a que puede establecerse

- una relación directa entre la capacidad antigénica de las proteínas y la accesibilidad superficial, la sustitución de los restos superficiales puede ser suficiente para hacer que la región variable murina sea "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y cols (1994) in
- 5 *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "chapado" porque únicamente se altera la superficie del anticuerpo, los restos estructurales no se alteran. Otras estrategias alternativas incluyen las que se describen en el documento
- 10 WO04/006955 y el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios) que utiliza los sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos que tienen una secuencia similar a la de la línea germinal humana (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics, enero de 2007, San Diego, California).
- 15 Para los expertos en la técnica será patente que el término "derivado" se pretende que defina no sólo la fuente en el sentido de que sea el origen físico del material sino que también define el material que estructuralmente idéntico al material pero que no tiene su origen en la fuente de referencia. Así, los "restos que se encuentran en el anticuerpo donante" no necesariamente tienen
- 20 que haber sido purificados a partir del anticuerpo donante.

- Está bien reconocido en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos se considera que son "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de sus cadenas laterales y las
- 25 sustituciones dentro de estos grupos que mantienen toda o sustancialmente

toda la afinidad de unión del anticuerpo terapéutico de la invención se consideran sustituciones conservadoras, véase la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

<u>Cadena lateral</u>	<u>Miembros</u>
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
Restos que influyen sobre la orientación de las cadenas	gly, pro
Aromáticas	trp, tyr, phe

5

1.1.3 Anticuerpos multiespecíficos y biespecíficos

Las proteínas de unión a antígenos de la presente invención pueden ser multiespecíficas es decir pueden unirse a más de un antígeno. En una realización particular, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo derivado que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes y también forma parte de la invención. Los procedimientos para preparar dichos anticuerpos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas H y cadenas L de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas H tienen especificidades de unión diferentes, véase Millstein y cols, Nature 305 537-539 (1983), el documento WO93/08829 y Traunecker y cols EMBO, 10, 1991,

15

3655-3659. Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales sólo una tiene la especificidad de unión deseada. Una estrategia alternativa implica fusionar los dominios variables con las especificidades deseadas a la
5 región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican estas fusiones y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina se insertan en vectores de
10 expresión separados y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Sin embargo es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas en un vector de expresión. En una estrategia preferida, el anticuerpo biespecífico está compuesto por una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena H y cadena L,
15 proporcionando una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO94/04690. Véase también Suresh y cols Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

La administración de las proteínas terapéuticas al cerebro ha sido dificultada
20 por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB) y existe una barrera retiniana similar entre el ojo y la corriente sanguínea. Se han propuesto diversas estrategias cuando se desea administrar una proteína de unión a antígenos de la invención, tal como un anticuerpo de la invención o fragmento de anticuerpo de la invención, a través de una barrera biológica tal como la
25 BBB para potenciar dicha administración cuando sea necesario y pueden ser

aplicables estrategias similares para permitir cruzar la barrera retiniana.

- Para obtener los nutrientes y factores necesarios de la sangre, la BBB posee algunos receptores específicos, que transportan compuestos de la sangre en
- 5 circulación al cerebro. Los estudios han indicado que algunos compuestos como la insulina (véase Duffy KR y cols (1989) Brain Res. 420:32-38), transferrina (véase Fishman JB y cols (1987) J.Neurosci 18:299-304) y los factores de crecimiento de tipo insulina 1 y 2 (véase Pardridge WM (1986) Endocrine Rev. 7:314-330 y Duffy KR y cols (1986) Metabolism 37:136-140)
- 10 atraviesan la BBB mediante transcitosis mediada por receptores. Los receptores de estas moléculas proporcionan así un medio potencial para que los anticuerpos terapéuticos de la invención accedan al cerebro usando los denominados anticuerpos "vectoriales" (véase Pardridge WM (1999) Advanced Drug Delivery Review 36: 299-321). Por ejemplo, se ha demostrado que un
- 15 anticuerpo contra el receptor de transferrina se transporta dinámicamente al parénquima cerebral (véase Friden PM y cols (1991) PNAS 88: 4771-4775 y Friden PM y cols (1993) Science 259: 373-377). Así, una estrategia potencial es producir un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico tal como se describe anteriormente en el que una primera especificidad sea hacia un
- 20 epítipo del péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal como se describe anteriormente y una segunda especificidad hacia un receptor de transporte localizado en la BBB por ejemplo una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de transferrina.
- 25 Otros anticuerpos biespecíficos previstos por la presente invención incluyen un

anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo que tiene una primera especificidad por β -amiloide y una segunda especificidad por un activador de la vía de complemento con el objetivo de inhibir su actividad, por ejemplo, pero sin excluir otros: un factor de complemento, tal como el factor de
5 complemento D.

Las proteínas multiespecíficas de unión a antígenos de la invención incluyen proteínas que tienen una primera especificidad por β -amiloide, tal como un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide tal
10 como se describe anteriormente, una segunda especificidad por un receptor de transporte situado en la BBB o en la barrera hematorretiniana y una tercera especificidad por un activador de la vía de complemento.

1.2 Fragmentos de anticuerpos y otras construcciones proteínicas, tales como dominios
15

En ciertas realizaciones de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un fragmento de unión a antígenos. Dichos fragmentos pueden ser fragmentos de unión de antígenos funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab',
20 F(ab')₂, Fv, ScFv de los anticuerpos que se describen anteriormente. Los fragmentos que carecen de la región constante de IgG2 humana carecen esencialmente de la capacidad de activar complemento por la ruta clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Además dichos fragmentos se producen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos
25 por ejemplo mediante digestión con papaina (véase por ejemplo, el documento

WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células
hospedadoras transformadas por vía recombinante. Para la producción de
ScFv, véase Bird y cols; (1988) Science, 242, 423-426. Además, los
fragmentos de anticuerpos pueden producirse usando una variedad de
5 técnicas de ingeniería tal como se describe más adelante.

Los fragmentos Fv parecen tener una menor energía de interacción de sus dos
cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los
dominios V_H y V_L , se han enlazado con péptidos (Bird y cols, (1988) Science
10 242, 423-426, Huston y cols, PNAS, 85, 5879-5883), enlaces disulfuro
(Glockshuber y cols, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) y mutaciones "knob
in hole" (Zhu y cols (1997), Protein Sci., 6, 781-788). Los fragmentos ScFv
pueden producirse mediante procedimientos notorios para los expertos en la
técnica véase Whitlow y cols (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2,
15 97-105 y Huston y cols (1993) Int. Rev. Immunol 10, 195-217. Los ScFv
pueden producirse en células bacterianas tales como *E.Coli* pero más
habitualmente se producen en células eucariotas. Una desventaja de los ScFv
es la monovalencia del producto, que impide aumentar la avidéz debido a una
unión polivalente, y a su corta semivida. Los intentos para solventar estos
20 problemas incluyen (ScFv)₂ bivalentes producidos a partir de ScFv que
contienen una cisteína adicional en el extremo C mediante acoplamiento
químico (Adams y cols (1993) Can.Res 53, 4026-4034 y McCartney y cols
(1995) Protein Eng. 8, 301-314) o mediante dimerización específica de sitio de
los ScFv que contienen un resto cisteína en el extremo C no emparejado
25 (véase Kipriyanov y cols (1995) Cell. Biophys 26, 187-204). De forma

alternativa, puede forzarse a los ScFv a que formen multímeros acortando el enlazador peptídico a entre 3 y 12 restos formando "diacuerpos", véase Holliger y cols PNAS (1993), 90, 6444-6448. Reducir todavía más el enlazador puede provocar la formación de trímeros de ScFV ("triacuerpos", véase Kortt y cols (1997) Protein Eng, 10, 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall y cols (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). La construcción de moléculas bivalentes de ScFV también puede lograrse mediante fusión genética con motivos de dimerización de proteínas formando "minianticuerpos" (véase Pack y cols (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) y "minicuerpos" (véase Hu y cols (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). Los tándems de ScFv-Sc-Fv ((ScFV)₂) también pueden producirse enlazando dos unidades de ScFv mediante un tercer péptido enlazador, véase Kurucz y cols (1995) J.Immol. 154, 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos pueden producirse a través de la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadenas únicas constituidas por el dominio V_H de un anticuerpo conectado mediante un enlazador corto al dominio V_L de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y cols (1998), Int. J. Can 77, 763-772. La estabilidad de dichos diacuerpos biespecíficos puede potenciarse mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones "knob in hole" tal como se describe anteriormente o mediante la formación de diacuerpos monocatenarios (ScDb) en los que se conectan dos fragmentos ScFv híbridos a través de un péptido enlazador véase Kontermann y cols (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188. Las moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles por ejemplo mediante la fusión de un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula de IgG o a un fragmento Fab a través de la región de bisagra véase Coloma y cols (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. De forma

alternativa, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de diacuerpos monocatenarios biespecíficos (véase Alt y cols, (1999) FEBS Lett 454, 90-94. También pueden formarse moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la dimerización o bien de tandems de

5 ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y cols (1998) FEBS Lett 432, 45-49) o una molécula monocatenaria que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tandem, véase Kipriyanov y cols, (1999) J. Mol.

10 Biol. 293, 41-56). Pueden crearse fragmentos biespecíficos $F(ab')_2$ mediante acoplamiento químico de fragmentos Fab' o mediante heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby y cols, (1992) J. Exp. Med. 175, 217-225 y Kostelny y cols (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553). También hay disponibles dominios V_H y V_L aislados, véanse los

15 documentos US 6.248.516; US 6.291.158; US 6.172.197.

La frase "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que se une específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región o dominio V diferente. Un

20 dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homomultímero o heteromultímero) con otras regiones variables o dominios variables diferentes, donde las otras regiones o dominios no son necesarios para unirse a los antígenos mediante el único dominio variable de inmunoglobulina (es decir, donde el dominio variable único de inmunoglobulina

25 se une a un antígeno de forma independiente de los dominios variables

adicionales). Un "anticuerpo de dominio único" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" que es capaz de unirse a un antígeno tal y como se usa el término en el presente documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de un anticuerpo único de otras especies tales como roedores (por ejemplo, tal y como se describe en el documento WO 00/29004, dAb de V_{HH} de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen, camello, llama, alpaca, dromedario, y guanaco, que producen anticuerpos con cadenas pesadas naturalmente carentes de cadenas ligeras. Tales dominios V_{HH} pueden humanizarse de acuerdo con técnicas estándar disponibles en la técnica, y dichos dominios se considera todavía que son "anticuerpos de dominio único" de acuerdo con la invención. Tal como se usa en el presente documento " V_H incluye dominios V_{HH} de camélidos.

También puede proporcionarse un fragmento de unión a antígenos mediante ordenación de una o más de las CDR en supercóntigos proteínicos no correspondientes a anticuerpos tales como un dominio. Un dominio puede unirse específicamente a un antígeno o epítipo de forma independiente de una región variable o dominio diferente. Este puede ser un anticuerpo de dominio, tal como se describe anteriormente, o puede ser un dominio que sea un derivado de un supercóntigo que se selecciona a partir del grupo constituido por CTLA-4, lipocalina, SpA, un Afficuerpo, un avimero, GroEl, transferrina, GroES fibronectina/adnectina, que se han sometido a bioingeniería de

proteínas para obtener la unión a un antígeno distinto del ligando natural.

En este contexto, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene estructura terciaria, independiente del resto de la proteína.

- 5 Generalmente, los dominios son responsables de las diferentes propiedades funcionales de las proteínas, y en muchos casos pueden añadirse, eliminarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único" es un dominio de un polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables
- 10 de los anticuerpos. Por lo tanto incluye, dominios variables de anticuerpos completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de los dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que han sido truncados o que comprenden extensiones en el
- 15 extremo N o C, así como fragmentos plegados de dominios variables que mantienen al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

1.3 Anticuerpos heteroconjugados

- 20 Los anticuerpos heteroconjugados son derivados que también forman una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente que se forman usando cualesquiera procedimientos de reticulación convenientes. Véase el documento US 4.676.980.

25

1.4 Otras modificaciones.

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores Fc (FcγR) actúa de mediadora de las funciones efectoras del anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y semivida/aclaramiento del anticuerpo. Pueden realizarse diversas modificaciones a la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora que se desee. En particular, las regiones constantes humanas que esencialmente carecen de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos incluye la región constante de IgG4, la región constante de IgG2 y las regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas como por ejemplo mutaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y/o 322 que se describen en los documentos EP0307434 (WO8807089), EP 0629 240 (WO9317105) y WO 2004/014953. Se ha descrito por separado que las mutaciones en los restos 235 ó 237 dentro del dominio CH2 de la región constante de la cadena pesada (numeración según Kabat; sistema de indexado EU) reducen la unión a FcγRI, FcγRII y la unión a FcγRIII y por lo tanto reducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Duncan y cols. Nature 1988, 332; 563-564; Lund y cols. J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappel y cols. PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton y Woof, Adv. Immunol. 1992, 51;1-84; Morgan y cols., Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh y cols., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Además, algunos informes también describen la implicación de algunos de estos restos en el reclutamiento o mediación de la citotoxicidad dependiente de complemento

(CDC) (Morgan y cols., 1995; Xu y cols., Cell. Immunol. 2000; 200:16-26; Hezareh y cols., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Por lo tanto, los restos 235 y 237 se han mutado ambos a restos de alanina (Brett y cols. Immunology 1997, 91; 346-353; Bartholomew y cols. Immunology 1995, 85; 41-48; y documento WO9958679) para reducir los efectos tanto de mediación por
5 complemento como por FcγR. Los anticuerpos que comprenden estas regiones constantes pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

Se puede incorporar un epitopo de unión de receptores de rescate al
10 anticuerpo para aumentar su semivida en suero véase el documento US 5.739.277.

Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y cols, (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-
15 6604 demostraron que un conjunto común de restos de IgG1 está implicado en la unión de todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un grupo de restos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγR cuando se alteraron a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y arracimados
20 cerca de la región de bisagra CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza únicamente el conjunto común de restos de IgG1 para su unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con restos diferentes además de los del conjunto común. La alteración de algunos restos redujo la unión solo a FcγRII (por ejemplo Arg-292) o a FcγRIII (por ejemplo Glu-293). Algunas variantes mostraron una unión mejorada a
25 FcγRII o FcγRIII pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo Ser-

267Ala mejoró la unión a FcγRII pero no afectó a la unión a FcγRIII). Otras
variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción en la
unión al otro receptor (por ejemplo Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y
redujo la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de
5 IgG1 habían combinado sustituciones con alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-
334. Se cree que el receptor neonatal FcRn está implicado en proteger a las
moléculas de IgG de la degradación y así potenciar la semivida en suero y la
transcitosis entre tejidos (véase Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16. 29-57
y Ghetie y cols (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Se determinó que
10 los restos de IgG1 humana que interactuaban directamente con FcRn humano
incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435.

El anticuerpo terapéutico de la invención puede incorporar cualquiera de las
modificaciones de la región constante anterior.

15

En una realización particular el anticuerpo terapéutico esencialmente carece
de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b)
mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En una
realización más particular la presente invención proporciona anticuerpos
20 terapéuticos de la invención que tiene uno cualquiera (o más) de los cambios
de los restos que se detallan anteriormente para modificar la
semivida/aclaramiento y/o las funciones efectoras tales como ADCC y/o
citotoxicidad dependiente de complemento y/o lisis por complemento.

25 En un aspecto adicional de la presente invención el anticuerpo terapéutico

tiene una región constante del isotipo IgG1 humano con sustituciones de alanina (u otras que la alteren) en las posiciones 235 (por ejemplo L235A) y 237 (por ejemplo G237A) (numeración de acuerdo con el esquema EU que se detalla en Kabat).

5

Otros derivados de la invención incluyen variantes de glucosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glucosilación de los anticuerpos en posiciones conservadas de sus regiones constantes tiene un profundo efecto sobre la función del anticuerpo, en particular las funciones efectoras
10 tales como las que se describen anteriormente, véase por ejemplo, Boyd y cols (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan las variantes de glucosilación de los anticuerpos terapéuticos de la presente invención en las que se añade, elimina o modifica uno o más restos carbohidratados. La introducción de un motivo asparragina-X-serina o asparragina-X-treonina crea
15 un sitio potencial para la unión enzimática de restos carbohidratados y puede usarse por lo tanto para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y cols (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 se aumentó la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG a través de un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o
20 alfa- 2,3-sialiltransferasa. Se cree que al aumentar la sialilación termina se aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, al igual que la mayoría de las glucoproteínas, habitualmente se producen en la naturaleza en forma de una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente obvia cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, en particular de
25 mamífero. Se ha desarrollado una variedad de procedimientos para fabricar

glucoformas definidas, véase Zhang y cols Science (2004), 303, 371, Sears y cols, Science, (2001) 291, 2344, Wacker y cols (2002) Science, 298 1790, Davis y cols (2002) Chem. Rev. 102, 579, Hang y cols (2001) Acc. Chem. Res 34, 727. Así, la invención se ocupa de una pluralidad de anticuerpos
5 terapéuticos (que pueden ser del isotipo IgG, por ejemplo IgG1) tal como se describe en el presente documento que comprende un número definido (por ejemplo 7 o menos, por ejemplo 5 o menos tal como dos o una única) glucoforma(s) de dichos anticuerpos.

10 Los derivados de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de proteínas, así como de reducir la capacidad antigénica e inmunógena de las
15 proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineales o ramificados) se ha investigado con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y cols (2000) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95. Una realización particular comprende un fragmento de unión a antígenos de la invención sin las funciones efectoras de a) activación de
20 complemento por la vía clásica; y b) mediación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; (tal como un fragmento Fab o un scFv) acoplado a PEG.

2. Procedimientos de producción

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en organismos

transgénicos tales como cabras (véase Pollock y cols (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20:1-55), ratones (véase Pollock y cols. *ib*) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4; 601-606, 5 Baez J y cols, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E y cols; (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590). Los anticuerpos también pueden producirse mediante síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención habitualmente se producen usando tecnología de cultivo celular recombinante notoria para los expertos en la técnica. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y 10 se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para su posterior propagación o expresión en una célula huésped. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el que comercializa Lonza Biologics), en particular en el que la célula huésped es CHO o NS0 (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se 15 secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo sondas de oligonucleótidos). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los que los plásmidos son una realización típica. Generalmente dichos vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un 20 elemento potenciador, a promotor y secuencias de terminación de la transcripción ligadas operablemente al polinucleótido de la cadena ligera y/o pesada de forma que se facilite la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo mediante transformación, transfección, 25 electroporación o transducción) en la misma célula huésped de forma

concurrente o secuencial o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

- 5 Será inmediatamente patente para los expertos en la técnica que debido a la redundancia del código genético, también hay disponibles polinucleótidos alternativos a los que se describen en el presente documento que codificarán los polipéptidos de la invención.

10 **2.1 Secuencias de señal**

- Las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la presente invención pueden producirse en forma de una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia de señal debería ser
- 15 reconocida y procesada por la célula huésped. Para las células huésped, la secuencia de señal puede ser una secuencia líder de alcalina fosfatasa, penicilinas, o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras, las secuencias de señal pueden ser una secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor α o secuencias líder de fosfatasa
- 20 véase por ejemplo el documento WO90/13646. En los sistemas celulares de mamífero, hay disponibles secuencias líder víricas tales como la señal gD de *Herpes simplex* y las secuencias de señal de inmunoglobulina nativa (tal como cadena pesada de Ig humana). Habitualmente la secuencia de señal está ligada en marco de lectura a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la
- 25 invención.

2.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación son notorios en la técnica, siendo pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias gram negativas, el plásmido 2μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes víricos tales como SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación de SV40 no es necesario para los vectores de expresión de mamífero integrados. Sin embargo, el SV40 ori puede estar incluido dado que contiene el promotor temprano.

2.3 Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o (b) complementan deficiencias auxotróficas o proporcionan nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de ambos. El esquema de selección puede suponer detener el crecimiento de las células huésped que no contienen vector o vectores. Las células, que se han transformado con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido por ejemplo a la resistencia a fármacos que confiere el marcador de selección administrado al mismo tiempo. Un ejemplo es el sistema de selección DHFR en el que los transformantes se generan en cepas huésped negativas para DHFR (por ejemplo véase Page y Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). En este sistema, el gen DHFR es administrado al mismo tiempo que la proteína de unión a antígenos, por

ejemplo anticuerpo, secuencias polinucleotídicas de la invención y después se seleccionan las células positivas para DHFR mediante privación de nucleósidos. Si fuera necesario, también se emplea el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación de genes de DHFR. Al ligar operablemente el gen de DHFR a la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, secuencias codificantes de la invención o derivados funcionales de los mismos, la amplificación del gen de DHFR produce la concomitante amplificación de la proteína de unión a antígenos deseada, por ejemplo anticuerpo, secuencias de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección de DHFR/metotrexato y los procedimientos para amplificar y seleccionar las células huésped usando el sistema DHFR están bien establecidos en la técnica véase Kaufman R.J. y cols J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, para una revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expresssion systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8): 870-80, agosto de 1998. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Bebbington y cols., Biotechnology 1992 Vol 10 página 169). Un gen adecuado para la selección para usar en levaduras es el gen *trp1*; véase Stinchcomb y cols Nature 282, 38, 1979.

2.4 Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención están ligados operablemente a ADN/polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígenos por ejemplo un anticuerpo. Los promotores para los huéspedes

procariotas incluyen el promotor phoA, sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, alcalina fosfatasa, triptófano y promotores híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levaduras incluyen 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas por ejemplo enolasa, 5 gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores de levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de 10 maltosa/galactosa.

Los promotores para la expresión en los sistemas celulares de mamífero incluyen promotores de ARN polimerasa II que incluyen promotores víricos tales como polioma, difteria aviar y adenovirus (por ejemplo adenovirus 2), 15 virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviario, citomegalovirus (en particular el promotor génico temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus de sarcoma de rous (RSV) y el virus simio temprano o tardío 40 y promotores no víricos tales como EF-1alfa (Mizushima y Nagata Nucleic Acids Res 1990 18(17): 5322. La elección del 20 promotor puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo para la expresión en eucariotas 25 superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de

o además de los que se encuentran localizados en los promotores que se describen anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas elemento potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. De forma alternativa, puede usarse un
5 elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de cytomegalovirus, potenciador de polioma, potenciador de baculovirus o el locus de IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). Aunque dichos potenciadores habitualmente están localizados en el vector en un sitio aguas arriba del
10 promotor, también pueden estar localizados en cualquier otro sitio por ejemplo en la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posición del promotor puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

15 **2.6 Poliadenilación/Terminación**

En los sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación están ligadas operablemente a un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, de esta invención. Dichas señales habitualmente están situadas 3' del marco de lectura abierto. En los sistemas
20 de mamífero, las señales ejemplares no limitantes incluyen las que se derivan de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes víricos (por ejemplo SV40) o repeticiones de terminación largas retrovíricas. En los sistemas en levaduras los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las que se derivan de los genes de
25 fosfoglicerato cinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En los

sistemas procariotas, las señales de poliadenilación habitualmente no son necesarias y en vez de eso es habitual emplear secuencias de terminación más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.7 Otros procedimientos/elementos para mejorar los rendimientos

Además de lo anterior, otros elementos que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones específica de la célula huésped. El uso de los codones de las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de esta invención puede modificarse de forma que se acomode a la tendencia de codones de la célula huésped de forma que se aumente la transcripción y/o el rendimiento del producto (por ejemplo Hoekema A y cols Mol Cell Biol 1987 7(8): 2914-24). La elección de los codones puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped que se usa para la expresión.

2.8 Células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar los vectores que codifican proteínas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias por ejemplo enterobacteriaceae tales como *Escherichia* por ejemplo *E.Coli* (por ejemplo ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo *Serratia*

marcescans y *Shigella* así como Bacilos tales como *B.subtilis* y *B.licheniformis* (véase el documento DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de las levaduras, también se contemplan huéspedes tales como *Saccharomyces cerevisiae*,
5 *schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), *yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, véase también Peng y cols J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillin*, *Tolipocladium* y *Aspergillus* , *A.nidulans* y *A.niger*.

10

Aunque la invención contempla específicamente células huésped procariontas y de levaduras, habitualmente sin embargo, las células huésped de la presente invención son células de vertebrado. Las células de vertebrado adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (N.º de ATCC. CRL 1650)
15 COS-7 (ATCC CRL 1651), línea renal embrionaria humana 293, PerC6 (Crucell), células renales de hámster neonato (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (N.º de ATCC: CRL 10314), 293 (N.º de ATCC CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo CHO-K1, N.º de ATCC: CCL 61, línea celular de CHO sin DHFR tal como DG44 (Urlaub y cols, Somat Cell Mol
20 Genet (1986) Vol 12 páginas 555-566), en particular las líneas de células CHO adaptadas para el cultivo en suspensión, células sertoli de ratón, células renales de mono, células renales de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células renales caninas (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de linfoma o mieloma por ejemplo
25 NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Así, en una realización de la invención se proporciona una célula huésped transformada de forma estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico tal como se describe en el presente documento. Habitualmente dichas células huésped comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Dichas células huésped también pueden diseñarse o adaptarse además para modificar la calidad, función y/o rendimiento de la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, de esta invención. Los ejemplos no limitantes incluyen expresión de enzimas modificadoras específicas (por ejemplo de glucosilación) y chaperonas de plegamiento de las proteínas.

15 **2.9 Procedimientos de cultivo celular.**

Las células huésped transformadas con vectores que codifican las proteínas terapéuticas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento conocidos por los expertos en la técnica. Las células huésped pueden cultivarse en matraces giratorios, matraces agitados, frascos giratorios, reactores por ondas (por ejemplo System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibras huecas pero para la producción a gran escala se prefieren reactores con tanque agitado o reactores en bolsas (por ejemplo Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey EE.UU.) en particular para los cultivos en suspensión. Habitualmente los tanques agitados están adaptados para contar con aireación usando por

ejemplo tubos burbugeadores, deflectores o impulsores de baja cizalla. Para las columnas con burbujas y los reactores neumáticos puede usarse aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero, aquel puede suplementarse con un

5 agente protector para las células tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir los daños a las células como resultado del procedimiento de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse o bien microtransportadores como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden estar adaptadas a un

10 cultivo en suspensión (que es lo habitual). El cultivo de células huésped, en particular de células huésped de vertebrado puede utilizar una variedad de modos de operación tales como en lotes, en lotes con alimentación, en lotes repetidos (véase Drapeau y cols (1994) Cytotechnology 15: 103-109), procedimiento en lotes extendido o cultivo con perfusión. Aunque las células

15 huésped de mamífero transformadas por medios recombinantes pueden cultivarse en medio que contenga suero como suero de ternero fetal (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven en medio sin suero tal y como se describe en Keen y cols (1995) Cytotechnology 17: 153-163, o medio disponible comercialmente tal como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex

20 NJ, USA), suplementado cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de células huésped puede requerir que esas células estén adaptadas al crecimiento en condiciones libres de suero. Una estrategia de adaptación es un cultivo de dichas células huésped en

25 medio que contiene suero y repetidamente cambiar un 80% del medio de

cultivo por el medio sin suero de forma que las células huésped aprendan a adaptarse a condiciones libres de suero (véase por ejemplo Scharfenberg K y cols (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. y cols editores), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Las proteínas de unión de antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención segregadas al medio pueden recuperarse y purificarse del medio usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso que se pretenda. Por ejemplo el uso de proteínas de unión a antígenos terapéuticas, por ejemplo los anticuerpos, de la invención para el tratamiento de pacientes humanos habitualmente requiere una pureza de al menos el 95% según se determina mediante SDS-PAGE reductora, más habitualmente 98% o 99% de pureza, comparada con el medio de cultivo que comprende las proteínas terapéuticas de unión a antígenos por ejemplo anticuerpos. Al principio habitualmente se eliminan los desechos celulares del medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando por ejemplo microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. De forma alternativa, la proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, puede recolectarse mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración profunda sin centrifugación previa. Hay disponible una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatita (HA), cromatografía por afinidad (que opcionalmente conlleva un sistema de marcado por afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el

documento US 5.429.746). En una realización, las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo los anticuerpos, de la invención, después de diversas etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía por afinidad con Proteína A o G seguida de etapas de cromatografía adicionales tales como
5 intercambio iónico y/o cromatografía de HA, intercambio de aniones o cationes, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Habitualmente, también se emplean diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Tras estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (habitualmente
10 monoclonal) que comprende al menos 10 mg/ml o más por ejemplo 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y por lo tanto supone una realización de la invención. Una concentración de 100 mg/ml o superior puede generarse mediante ultracentrifugación. De forma adecuada, dichas preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

15 Los sistemas bacterianos están adecuados en particular para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos están localizados en el interior de las células o en el periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles pueden extraerse y replegarse formando proteínas de acuerdo con
20 procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, véase Sanchez y cols (1999) J. Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM y cols (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3. Composiciones farmacéuticas

Las preparaciones de proteínas de unión a antígenos purificadas, por ejemplo
25 anticuerpos, de la invención (en particular preparaciones monoclonal) tal como

se describe anteriormente, pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos tales como los que se describen anteriormente. Habitualmente dichas composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente
5 aceptable (es decir inerte) tal y como es conocido y requiere la práctica farmacéutica aceptable, véase por ejemplo Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículo esterilizado tal como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponadas con tampones adecuados tales
10 como acetato sódico trihidratado a un pH farmacéuticamente aceptable, tal como a un pH en un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas inyectables (*por ejemplo* por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraportal o por administración local al ojo mediante aplicación tópica o periocular al ojo o inyección intravítrea en el ojo) o
15 para infusión continua están sustancialmente libres de materia particulada visible y pueden comprender de 1 mg a 10 g de proteína terapéutica de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo, habitualmente de 5 mg a 1 g, más específicamente de 5 mg a 25 mg o 50 mg de proteína de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpo. Los procedimientos para la preparación de dichas
20 composiciones farmacéuticas son notorias para los expertos en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden de 1 mg a 10 g de proteínas terapéuticas de unión a antígenos, por ejemplo anticuerpos, de la invención en forma monodosis, opcionalmente junto con instrucciones de uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar liofilizadas
25 para su reconstitución antes de la administración de acuerdo con

procedimientos notorios u patentes para los expertos en la técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de iones metálicos que incluyen cobre, tal como citrato (por ejemplo citrato sódico) o EDTA o histidina, a la
5 composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por los metales de los anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un solubilizante tal como una base arginina, un detergente/agente contra la agregación tal como polisorbato 80, y un gas inerte tal como nitrógeno para
10 sustituir el oxígeno del espacio superior del vial.

Las dosis eficaces y las posologías para administrar la proteína de unión a antígenos, por ejemplo el anticuerpo, de la invención generalmente se determinan de forma empírica y dependen de factores tales como la edad,
15 peso y estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Dichos factores están dentro del alcance del médico a cargo. Las directrices para seleccionar las dosis apropiadas pueden encontrarse por ejemplo en Smith y cols (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, Nueva York pero en general serán de 1 mg a 10 g. En una realización, la pauta
20 para tratar a un paciente humano es de 1 mg a 1 g de anticuerpo terapéutico de la invención administrados por vía subcutánea una vez a la semana o cada dos semanas, o mediante infusión intravenosa cada 1 ó 2 meses. Dicha dosis corresponde a 0,014-140 mg/kg, tal como 0,014-14 mg/kg. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse de forma profiláctica.

25

Las composiciones también pueden administrarse de forma más local al ojo o mediante aplicación tópica, o por inyección intravítrea o por administración periocular, es decir bajo la esclerótica mediante inyección retrobulbar, peribulbar, subtenon o subconjuntiva. La administración sistémica puede ser

5 suficiente para lograr una reducción drusen mediante una administración pasiva, por ejemplo intravenosa del anticuerpo terapéutico. Otras vías de administración local pueden permitir al anticuerpo terapéutico alcanzar el segmento posterior del ojo más fácilmente a dosis menores. Se ha descrito la aplicación tópica para permitir la penetración de fragmentos de anticuerpos la

10 parte posterior del ojo en el modelo de conejo, (Williams KA, Bereton HM, Farrall A, Standfield SD, Taylor SD, Kirk LA, Coster DJ (2005) Eye 19; 910-913). Se ha descrito la inyección intravítrea de los fragmentos de anticuerpos o de anticuerpos monoclonales completos y los pacientes de AMD la toleran bien para los productos ranibizumab y bevacizumab. El anticuerpo terapéutico

15 también puede administrarse mediante un implante intravítreo. Las inyecciones retrobulbares y peribulbares pueden lograrse con agujas especiales de calibre 23 a 26 y son menos invasivas que las inyecciones intravítreas. La inyección subtenon coloca la composición en contacto con la esclerótica durante un periodo más prolongado que podría ayudar a la penetración a la parter

20 posterior del ojo. La inyección de proteínas justo debajo de la conjuntiva se ha descrito en modelos de conejo y esto permite que las moléculas se difundan de una forma más directa a través de la esclerótica para alcanzar el segmento posterior del ojo. Los sistemas de administración de fármacos de liberación mantenida pueden usarse también de forma que permitan liberar el material

25 durante un intervalo de tiempo mayor al interior o alrededor del ojo de forma

que la administración pudiera ser menos frecuente. Dichos sistemas incluyen micelas, geles, hidrogeles, nanopartículas, microcápsulas o implantes que pueden estar rellenos o recubiertos con composiciones terapéuticas. Estos pueden administrarse al cristalino ocular mediante inyección o por cualquiera
5 de las otras vías menos invasivas descritas anteriormente, es decir por la vía periocular o subesclerótica. Los ejemplos de dichos sistemas de liberación mantenida y vías de administración local incluyen hidrogeles de liberación lenta termosensibles para la administración subesclerótica o intravítrea de una formulación con base de nanopartículas dirigida a la retina posterior y a la capa
10 RPE (Janoira KG, Gunda S, Boddu SHS, Mitra AK, (2007) Expert Opin Drug Deliv 4: 371-388; Birch DG, Liang FQ, (2007) Int J Nanomed 2:65-77). Son posibles muchas otras combinaciones de sistema de administración y vía de administración local y podrían considerarse para las composiciones de anticuerpo terapéutico. Un anticuerpo también puede administrarse mediante
15 un dispositivo físico tal como mediante iontoforesis (Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2008, Annual meeting, 27 de abril – 1 de mayo, Ponencias n.º 98/A125 y n.º 1813/D693 de EyeGate Pharma: Blalock y cols., & Ruiz-Perez y cols).

20 **4. Usos clínicos.**

Se apreciará que las enfermedades que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados incluyen enfermedad de Alzheimer, deficiencia cognitiva leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis de tipo Holandés, angiopatía β -amiloide cerebral
25 y diversos tipos de demencias degenerativas, tales como las asociadas a la

enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer de tipo con cuerpos de Lewis difusos, degeneración macular senil (AMD), enfermedades de "tipo Glaucoma" y formación de cataratas dependiente de A β .

5

En una realización de la invención, la enfermedad que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados es la enfermedad de Alzheimer.

10 En una realización adicional de la invención, la enfermedad que se caracterizan por niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide elevados es degeneración macular senil (AMD), enfermedades de "tipo Glaucoma" y formación de cataratas dependiente de A β .

15 Aunque la presente invención se ha descrito principalmente con relación al tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede aplicarse en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

20 **Ejemplos**

Métodos

ABi8200 Sistema de detección celular macro confocal por fluorescencia para FMAT de Applied Biosystems 8200

25 Biacore[™]/Biacore Un dispositivo que permite la medición de la

		cinética en tiempo real de las interacciones moleculares usando SPR
	CM5	Chip sensor de Biacore TM con una superficie para usos variados recubierta con una matriz de dextrano carboximetilado
5		
	cSLO	Oftalmoscópico láser de barrido confocal
	ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
	FMAT	tecnología de ensayo fluorométrico en microvolumen (Applied Biosystems)
10	FPLC	cromatografía líquida rápida de proteínas
	IHC	Inmunohistoquímica
	Integra CL1000	Mini-biorreactores comercializados por IBS Integra Biosciences
	MSD®	Meso Scale Discovery
15	ProSepA HiTrap	Columnas de Proteína A para FPLC que comercializa GE Healthcare
	RU	Unidad de resonancia (unidad arbitraria para cuantificar la unión a un chip sensor en mediciones en Biacore)
20	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
	SPR	(resonancia de plasmón superficial) – fenómeno físico que emplean los aparatos Biacore TM para la medición de los cambios en la masa del chip sensor
25		

SPSS	paquete de software de análisis estadístico
SRU SRU BIND™	Tecnología de biosensores que permite controlar las interacciones bioquímicas sin marcadores

5 **Materiales**

	BSA	albúmina de suero bovina
	C57/BL6	"C57 black 6" - cepa endógama habitual de ratones de laboratorio
10	DAB	3,3'-diaminobencidina
	DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
	DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	DTT	ditiotreitól
15	EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
	FA	ácido fórmico
	FCS	suero de ternero fetal
	FITC	isotiocianato de fluoresceína
	Glutamax	forma estable de glutamina que se añade al medio de cultivo (suplemento dipeptídico L-Ananil-L-Glutamina)
20	HEK	células renales embrionarias humanas 293
	Tampón de HBS-EP	Tampón Biacore™ para usos variados que contiene HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%
25		

	HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
	Histoclear	agente clarificador tisular
	HRP	peroxidasa de rábano
	IMS	licor metilado industrial
5	Lipofectamina	agente de transfección basado en lípido catiónico que comercializa Invitrogen/Gibco
	NaCl	cloruro sódico
	Opti-MEM	medio basado en el medio de Eagle modificado de Invitrogen/Gibco
10	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PFA	paraformaldehído
	PEG	polietilenglicol
	PPD	derivado de proteína purificado
	PRF F12	medio sin rojo de fenol con Nutrient Mixture F-12
15	RIBI	adyuvante antigénico con base de emulsión de aceite en agua
	RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
	TASTPM	cepa de ratones doblemente transgénica creada por el cruce de ratones Swedish con mutación APP695 (<u>TAS10</u>) con una cepa PS-1M146V (<u>TPM</u>)
20	TBS	solución salina tamponada con TRIS
	Transfast	agente de transfección liposómico que comercializa Promega
25	Tris HCl	clorhidrato de tris-(hidroximetil)aminometano

Tween-20	monolaurato de polioxietilensorbitán
Versene	agente de quelación de iones metálicos (ácido etilendiaminatetraacético)

5

Abreviaturas

	AMD	degeneración macular senil
	APP	proteína precursora amiloide
10	BM	membrana de Bruch
	CFH	factor de complemento H
	CFI	factor de complemento I
	CHO	células de ovario de hámster chino
	CNV	neovascularización de las coroides
15	CPM	recuentos por minuto
	CSF	fluido cerebrospinal
	ICV	intracerebroventricular
	IgG	inmunoglobulina gamma
	i.p.	intra-peritoneal
20	hAPP	proteína precursora amiloide humana
	HIER	recuperación de antígenos inducida térmicamente
	HVT	voluntario sano
	KD	constante de disociación en el equilibrio
	NDS	suero de burro normal
25	MO	meses de edad

MRT	tiempo de permanencia medio
OS	segmentos exteriores
RPE	células epiteliales de pigmento retiniano

5

Generación de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para beta amiloide humano

- Un conjunto de ratones se inmunizaron inicialmente con el péptido CGGGNKGAIIGLMVGG (que contiene los restos 27-38 de β -amiloide) (SEC
- 10 ID N.º: 7) acoplado en el extremo N a PPD. La respuesta inmunitaria de estos ratones se evaluó tomando una muestra de suero y analizándola en un ELISA con conjugados de ovoalbúmina del mismo péptido para determinar la valoración de anticuerpos para los ratones inmunizados. Sólo se observaron respuestas débiles. En otro experimento se inmunizó un conjunto de ratones
- 15 con 10 μ g del péptido CGGGEDVGSNKGAIIGLMVGG (que contiene los restos 22-38 de β -amiloide) (SEC ID N.º: 73) conjugado a PPD acoplado en el extremo N (derivado de proteína purificado; Cambridge Research Biochemicals) en adyuvante RIBI por vía intraperitoneal. La respuesta inmunitaria de estos ratones se evaluó de nuevo tomando una muestra de
- 20 suero 7 días después de cada refuerzo y analizándola en un ELISA del mismo péptido para determinar la valoración de anticuerpos para los ratones inmunizados. Una vez los ratones hubieron alcanzado una respuesta óptima (basándose en un análisis comparativo de la valoración de los anticuerpo en las dos últimas muestras de suero) reforzando con 2,5 μ g de conjugado
- 25 peptídico, se sacrificó al ratón con la mejor valoración de anticuerpos y se

extrajo el bazo para la generación de hibridomas. Los hibridomas se generaron obteniendo las células de bazo y fusionándolas con células de mieloma usando metodología con PEG (polietilenglicol). La población de células mixtas resultante se plaqueó después en placas de cultivo celular de 96 pocillos.

5

Cada uno de los anticuerpos expresados contenido en el sobrenadante del cultivo se tamizó después en un inmunoensayo homogéneo de FMAT (Tecnología de ensayo en microvolumen por fluorescencia). Se identificaron 29 anticuerpos positivos en esta cascada de tamizado que dieron negativo para la

10 proteína ovoalbúmina absorbida de forma pasiva sobre perlas de poliestireno pero dieron positivo para:

- (i) conjugado de ovoalbúmina acoplado en el extremo N a CGGGEDVGSNKGAIIGLMVGG (22-38) (SEC ID N.º: 73) unido a perlas de poliestireno,
- 15 (ii) péptido β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo N unido a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina,
- (iii) péptido β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo C unido a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina y
- (iv) péptido β -amiloide (24-34) biotinilado en el extremo N, donde los restos 24-
- 20 34 de β -amiloide que son VGSNKGAIIGL (SEC ID N.º: 8), están unidos a perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina.

Las muestras de sobrenadante con anticuerpos seleccionadas se analizaron para determinar la cinética de la unión al péptido β -amiloide (1-40) tal como se

25 detalla más adelante.

Determinación de las velocidades de disociación de la interacción de unión (kd) usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial

Se usó un instrumento Biacore A100 para proporcionar la cinética de la velocidad de disociación para la interacción de los 29 anticuerpos seleccionados con β -amiloide (1-40). Para esto, se derivaron cubetas de flujo de un chip sensor Biacore con estreptavidina con niveles bajos β -amiloide (1-40) biotinilado en el extremo N. Se generaron tres curvas para cada muestra de anticuerpo y se introdujeron en ecuaciones de velocidad para obtener las velocidades de disociación. Para los 12 clones no fue posible establecer un clasificación en base a la velocidad de disociación porque no era posible medir la velocidad de disociación con las condiciones experimentales elegidas. Sin embargo, en estas condiciones, los 12 clones mostraron una velocidad de disociación (kd) de al menos 10^{-5} .

ELISA de unión de -amiloide humano

Los 29 anticuerpos contenidos en los sobrenadantes de los hibridomas identificados anteriormente se volvieron a analizar para determinar su unión a β -amiloide (1-40) humano mediante ELISA. Para lograr una comparación válida, se determinó la concentración del anticuerpo contenido en los sobrenadantes del cultivo usando un ELISA de cuantificación de IgG. Para determinar el isotipo del anticuerpo funcional a β -amiloide humano, se llevó a cabo un ELISA de unión usando un conjunto de anticuerpos de detección específicos de isotipo. Los 29 anticuerpos se unían a β -amiloide (1-40) humano en este formato de ELISA. Los isotipos para cada clon de anticuerpo unido podrían identificarse mediante el anticuerpo secundario específico de

isotipo que se usaba contra IgG1, IgG2a o IgG2b. En un caso se observó una mezcla de isotipos funcionales.

Mapeo de epítomos mediante ELISA usando péptidos superpuestos

- 5 Los epítomos reconocidos por los 29 anticuerpos que se seleccionaron a partir del tamizado primario y contenidos en los sobrenadantes del hibridoma se mapearon mediante ELISA usando un conjunto de 31, péptidos 12-meros superpuestos que cubrían la secuencia completa del péptido β -amiloide 1-42. Todos los péptidos contenían un enlazador de 3 aminoácidos en el extremo C
10 (glicina-serina-glicina) y un resto lisina biotinilado en el extremo.

- Se recubrieron placas de inmunoensayo de 96 pocillos toda la noche a 4 °C con 100 μ l de estreptavidina a 0,5 μ g/pocillo (Sigma) en agua destilada. Se lavaron las placas tres veces (PBS/0,01% de Tween 20) y los pocillos se
15 bloquearon con 250 μ l/ pocillo de BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se añadieron 100 μ l de soluciones de péptidos (0,5 μ g/pocillo en 1% de BSA 0,1% de Tween 20 en PBS) a pocillos triplicados, durante 3 horas a temperatura ambiente. También se prepararon pocillos de control únicamente con DMSO. Las placas se
20 lavaron tres veces y se añadieron 100 μ l de los 29 sobrenadantes de hibridoma (diluidos 1/20 en 1% de BSA/ 0,1% de Tween 20) a todos los pocillos y se incubó a 4 °C toda la noche. Las placas se lavaron tres veces y se añadió conjugado de anticuerpo contra IgG de ratón y peroxidasa de rábano (Amersham, diluido 1:2000 en 1% de BSA, 0,1% de Tween 20 en PBS) a 100
25 μ l/pocillo. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente,

se lavaron tres veces, y la unión del anticuerpo de detección se reveló usando 100 µl/pocillo de sustrato de tetrametilbencidina (Sigma) durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente controlando el desarrollo de color azul. La reacción se terminó y la densidad óptica se leyó para cada
5 pocillo a 450 nm.

Todos los anticuerpos se unían a una región muy similar que contenía el motivo KGAIIGLM (equivalente a los restos 28-35 de β-amiloide) (SEC ID N.º: 9).

10 **Cinética de unión determinada mediante ensayo de resonancia de plasmón superficial**

Se evaluaron las afinidades de unión por β-amiloide y la cinética de 8 anticuerpos monoclonales que se seleccionaron a partir del conjunto de 29 en más detalle usando tecnología Biacore 3000. Las preparaciones de
15 anticuerpos de ratón purificadas se capturaron sobre una superficie de chip con anticuerpo policlonal contra IgG de ratón. Se diluyó β-amiloide 1-40 humano preparado reciente con tampón de HBS-EP y se hizo pasar sobre la superficie con anticuerpo capturado a concentraciones que variaban en el intervalo de 4-500 nM durante 5 minutos. La disociación después de la
20 inyección se observó durante otros 20 minutos más. La regeneración se logró mediante un toque de H₃PO₄ 100 mM. Se demostró que los posteriores ciclos de captura de anticuerpo y unión a β-amiloide no se veían afectados por la regeneración. Todos los experimentos incluían una doble referencia con una superficie de blanco y con inyecciones de tampón de blanco. Los datos
25 obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 - Datos de afinidad y cinética por Biacore para ocho anticuerpos purificados seleccionados; los valores de KD que se muestran son de un experimento

5

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
2C1	6,63e4	1,29e-4	1,95
5C9	6,11e4	1,64e-4	2,69
4D4	7,32e4	8,27e-5	1,13
5D1	5,7e4	1,47e-4	2,57
6F6	1,06e5	6,57e-5	0,62
14B3	7,48e4	7,11e-5	0,95
2E11	8,45e4	1,7e-4	2,01
16D4	8,12e4	6,18e-4	7,62

Los resultados mostraron que las afinidades de los 8 anticuerpos monoclonales eran comparables aunque 16D4 mostró una afinidad al menos de 12 a 2,5 veces menor que los otros clones. Las diferencias en los valores de KD entre los 7 anticuerpos restantes en este experimento eran de hasta 4,4 veces. Dos de estos clones, 5D1 y 6F6, se seleccionaron para realizar estudio a mayor escala y se analizaron por triplicado. Estos datos se muestran en la Tabla 3.

15 **Tabla 3 - Datos de cinética y afinidad por Biacore para anticuerpos**

monoclonales purificados 6F6 y 5D1 (experimento por triplicado)

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
5D1	6,58e4	1,35e-4	2,05
(n=3)	±0,38e4	±0,10e-4	±0,15
6F6	9,93e4	9,4e-5	1,02
(n=3)	±0,93e4	±3,2e-5	±0,41

El mismo procedimiento por Biacore se usó también para investigar la unión de
5 6F6 a β -amiloide (1-40) y β -amiloide (1-42) humanos y murinos. El 6F6 se unió
a todos estos péptidos con valores similares.

Unión a proteína precursora amiloide expresada en células (APP)

El β -amiloide está compuesto por péptidos formados por escisión proteolítica
10 de una proteína precursora transmembrana de tipo I denominada proteína
precursora amiloide (APP). Dado que la APP tiene un gran dominio
extracelular, la unión a esta proteína podría potencialmente iniciar una
reacción de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC).

15 **Ensayo con base de FMAT™ ABI8200**

Se usó tecnología de ensayo en microvolumen fluorométrico (FMAT; sistema
de detección celular 8200) para realizar un ensayo de unión con base celular a
una proteína precursora amiloide expresada en células HEK 293T con los 8
anticuerpos seleccionados anteriormente. Las células HEK293T, o bien con

transfección simulada o transfectadas con un plásmido que codifica APP humana de longitud completa se recolectaron 48 horas después de la transfección. Las células transfectadas se incubaron con diversas diluciones de los sobrenadantes de los hibridomas o con anticuerpos de control positivos

5 LN27 (Zymed) IgG de ratón contra el dominio extracelular de APP y un anticuerpo de control negativo que sólo reconoce el extremo N libre del péptido β -amiloide (reactivo del laboratorio). La unión de los anticuerpos se reveló usando FMAT azul marcado contra anticuerpo de ratón y se detectó usando el sistema de detección celular 8200. Las señales de fondo obtenidas de las

10 células con transfección simulada se restaron de las células transfectadas con APP. 7 clones no mostraron unión a APP expresada en células HEK293T comparadas con el anticuerpo monoclonal de control positivo LN27. Al estudiar los resultados con las células HEK293T con transfección simulada un clon (5C9) mostró indicios de unión no específica a las células HEK293T haciendo

15 difícil la interpretación de la capacidad de unión a APP de este clon particular.

Unión a proteína precursora amiloide (APP) en cortes de cerebro de ratones transgénicos

20 Se investigaron cortes de cerebro de 2 ratones TASTPM de dos meses de edad (Howlett y cols. 2008) o de ratones TAS10 de 12 meses de edad mediante IHC. Los cortes se trataron con ácido fórmico al 85% y se tiñeron para detectar la unión a APP de longitud completa. A la edad elegida, los ratones respectivos no muestran depósitos de placas de amiloide aunque parte

25 de la tinción puede deberse a que el amiloide intracelular sea accesible al usar

esta técnica. El 6F6 no mostró tinción en estos cortes mientras que un anticuerpo de control para APP de longitud completa (Zymed) si mostró tinción.

5 **ELISA de unión a -amiloide humano en forma de fragmento Fab**

Se generó un fragmento Fab de 6F6 mediante escisión con proteasas estándar usando papaína inmovilizada sobre perlas (Pierce n.º 20341). Se realizó un ELISA para determinar su unión a péptido A β (1-40) humano inmovilizado en una placa de ELISA con fragmentos Fab de la IgG 6F6 purificados. El resultado de un único experimento ELISA mostró que un fragmento Fab de 6F6 todavía es capaz de unirse a un péptido A β (1-40).

15 **Unión de 6F6 a amiloide humano nativo en muestras de plasma de voluntarios humanos**

Se extrajo sangre completa de voluntarios sanos (HVT) en un tubo K2 EDTA mediante venopunción y el tubo se metió en hielo de forma inmediata. La muestra de sangre se procesó en 30 minutos centrifugando a 2000 x g durante 15 minutos a 4 °C para obtener el plasma. Después se añadió inhibidor de proteasas (Roche Complete Protease Inhibitor cocktail, n.º de cat.: 11 973 580 001, Roche Applied Science) al plasma de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de plasma se congelaron después a menos de -70 °C antes de analizar.

El ensayo usó 6F6 como anticuerpo de captura en un formato de inmunoensayo ECL en 96 pocillos (Meso Scale Discovery, MSD). De forma resumida, el 6F6 se recubrió en puntos sobre una placa de MSD de 96 pocillos; después se añadieron muestras (ensayo de calibrado, control negativo, QC y muestras de prueba). Tras la incubación, el material no unido se eliminó por lavado y el anticuerpo de detección (4G8 biotinilado, (específico para el epítipo de β -amiloide 17-24)) se aplicó después para incubar. Esto vino seguido de la adición de estreptavidina-sulfo-TAG después de lavar. Al final de esta incubación, se aplicó una etapa de lavado. La adición de tampón de lectura T de MSD a la placa permitió leer una señal electroquimioluminiscente en el MSD Sector Imager 6000. La concentración de analito se calculó a partir de la señal de MSD usando una curva estándar de ensayo establecida con concentraciones conocidas de A1-42. El límite inferior de cuantificación para el ensayo era de 78,1 pg/ml.

La Tabla 4 resume las concentraciones de A β de 10 muestras de plasma de voluntarios sanos medidas mediante el ensayo con anticuerpos 6F6-4G8 descrito anteriormente. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Tabla 4. Concentración de Aβ en muestras de voluntarios sanos medida mediante anticuerpos contra 6F6-4G8

	Muestra	Rep1	Rep2	Media
5	HVT1	695,780	653,251	674,517
	HVT2	602,650	596,211	599,431
	HVT3	685,350	684,026	684,688
	HVT4	660,760	653,754	657,259
	HVT5	629,980	582,975	606,478
	HVT6	524,470	517,987	521,230
	HVT7	681,420	678,934	680,175
	HVT8	618,910	579,181	599,045
	HVT9	616,190	605,367	610,779
	HVT10	1029,050	947,771	988,413
10			Media	662,202
			DT	125,153

Unión a A1-42 en condiciones naturales y desnaturalizantes mediante transferencia western

15 Se investigó el anticuerpo monoclonal 6F6 purificado para determinar su unión a diversas formas de Aβ1-42 y se analizó en SDS-PAGE natural o desnaturalizante. Aβ 1-42 se usó o bien de preparación reciente o pretratado toda la noche con PRF F12 a 4 °C, toda la noche en PBS a 37 °C o toda la

20 noche en HCl 10 mM a 37 °C. Las preparaciones se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia Western usando el anticuerpo 6F6 o 6E10 (anticuerpo específico para Aβ 1-16 humano; reactivo comercial, Eurogentec) y 5G5 (anticuerpo específico para Aβ1-42; reactivo propio). Los resultados mostraron que en los geles naturales 6E10 reconoce formas

25 superiores de amiloide mientras que 6F6 y 5G5 únicamente mostraron una

señal relativamente débil contra estas formas oligoméricas y fibrilares. En condiciones desnaturalizantes, 6F6 y 5G5 de forma predominante reconocieron formas monoméricas de beta amiloide mientras que 6E10 específico del extremo N fue todavía capaz de unirse a agregados superiores de beta amiloide que no se resolvieron mediante las condiciones de desnaturalización que se usaron en este experimente Fig. 1). En conclusión esto indica que en estas condiciones y usando las preparaciones de amiloide que se describen anteriormente 6F6 se une con preferencia a las formas de menor peso molecular y a los monómeros de A β 1-42.

10

Mapeo de epítomos mediante ELISA de anticuerpo monoclonal 6F6 purificado

Se usó anticuerpo monoclonal 6F6 purificado para repetir el mapeo de epítomos descrito anteriormente mediante ELISA. El protocolo que se utilizó era el mismo salvo que se añadieron 100 μ l de solución de anticuerpo purificado diluido (0,1 μ g/ml en 1% de BSA) en lugar de sobrenadante de cultivo de hibridomas.

El anticuerpo monoclonal 6F6 purificado se unió al motivo KGAIIGL (equivalente a los restos 28-34 de β -amiloide) pero la unión se potenciaba mucho si se incluía el resto 35M en el péptido (equivalente a los restos 28-35 de β -amiloide; (SEC ID N.º: 9)). No pueden excluirse contribuciones menores de los restos próximos usando técnicas de mapeo de epítomos superpuestos.

25

Mapeo de epitopos mediante resonancia de plasmón superficial del anticuerpo monoclonal 6F6

El anticuerpo monoclonal 6F6 purificado se inyectó durante 3 minutos a 8-64 nM sobre péptidos biotinilados en el extremo C que representaban 24-35 (SEC ID N.º: 10: VGSNKGAIIGLMGSG), 28-39 (SEC ID N.º: 11: KGAIIGLMVGGVGS) y 31-42 (SEC ID N.º: 12: IIGLMVGGVVIAGSG) de la secuencia de β -amiloide capturada mediante un chip sensor recubierto con estreptavidina. El experimento se realizó usando un aparato Biacore 3000. Los resultados mostraron que 6F6 era capaz de unirse al péptido 24-35 y 28-39 pero no al péptido 31-42 de β -amiloide, lo que confirma los resultados con péptidos superpuestos anteriores. También puede indicar que los restos 31-35 no son suficientes para su unión a 6F6 y los restos más allá de la posición 35 parecen no estar implicados en la unión de este anticuerpo.

Efecto de la administración intravenosa de los anticuerpos monoclonales 6F6 y 5D1 contra β -amiloide sobre los niveles de amiloide en sangre tras la administración central de amiloide

El objetivo de este estudio era investigar los niveles de radioactividad en sangre tras la inyección intracerebroventricular (ICV) de ^{125}I (1 μCi) de β -amiloide 1-40, en ratones a los que previamente se les había inyectado el anticuerpo de prueba.

Se administró ^{125}I (1 μCi) de β -amiloide 1-40 a ratones C57BL6/J macho canulados ICV (n=8-10 por tratamiento) mediante infusión ICV. Una hora antes de la infusión ICV de ^{125}I de β -amiloide 1-40, se les inyectó a los ratones o bien

solución salina tamponada con fosfato (PBS) o 600µg de anticuerpo monoclonal contra β-amiloide 6F6 o 5D1 por vía intravenosa. Los animales se devolvieron a sus jaulas después de la infusión ICV y a las 4 horas de la infusión ICV se sacrificaron y se tomaron muestras de la sangre y se
5 detectaron los recuentos por minuto (CPM) de radiación gamma.

Preparación quirúrgica.

Se anestesió a los ratones mediante inhalación de isofluorano (3-5%) y se posicionaron en un marco estereotáxico. Antes de los procedimientos
10 quirúrgicos, los ratones recibieron 0,05 ml (dilución 1:10 de solución madre) de vetergesic® subcutáneo (Buprenorfina) como analgésico. Se practicó una incisión en la línea media del cuero cabelludo y el aspecto dorsal del cráneo se limpió y se secó. Se introdujo una cánula en el ventrículo lateral mediante un agujero taladrado en el cráneo a las siguientes coordenadas estereotáxicas
15 relativas al temporal (anterioposterior (AP): -0,5 lateral (L): +0,7 dorsal/ventral (DV): -2,5). Se taladraron otros dos agujeros a través del cráneo en los que se introdujeron tornillos corticales. La cánula se ancló para que no se moviera mediante un gel de cianoacrilato y la incisión se suturó alrededor del tapón superior de gel de cianoacrilato. Tras la operación los ratones recibieron 0,3 ml
20 de solución salina por vía subcutánea y se dejaron en un entorno caliente para que se recuperaran de la anestesia. Cuando se incorporaron de nuevo, los ratones se alojaron de uno en uno y se sometieron a 5 días de cuidados postoperatorios estándar. No se realizó ningún otro procedimiento durante 5 días o hasta que volvieron al peso anterior a la operación.

25

Colocación de la cánula

Después de la recuperación, se verificó la colocación de la cánula mediante la respuesta a la angiotensina II de ingestión de agua. Cada ratón recibió la administración ICV de 100 ng de angiotensina II. Después de la
5 administración, se observó la ingestión de agua durante 15 minutos.

Resultados

Se observó un aumento significativo de la radioactividad en la sangre de los animales a los que se les administró ambos anticuerpos monoclonales 6F6 y
10 5D1 comparados con los animales a los que se les administró vehículo presumiblemente debido a la capacidad de unirse a β -amiloide radiomarcado en circulación y extendiendo así la semivida en sangre del péptido β -amiloide 1-40 marcado. Las diferencias entre los anticuerpos monoclonales no fueron significativas. El tratamiento con 6F6 y 5D1 provocó un aumento
15 estadísticamente significativo de CPM comparado con el control de vehículo inyectado – (CPM: vehículo 1280 +/- 312; 5D1 8152 +/- 2001; 6F6 8875 +/- 2123) Univariate ANOVA, $F(3,32) = 15,14$ $p < 0,001$ (los datos se han convertido a logarítmicos), prueba LSD post-hoc $***p < 0,001$ todos los grupos comparados con el vehículo.

20

Investigación de la farmacocinética de la formación del complejo de 6F6 y amiloide en cobayas

El objetivo de este estudio era determinar la formación de complejos de anticuerpo y β -amiloide *in vivo* en cobayas que tienen una secuencia de
25 aminoácidos de β -amiloide idéntica a la de los seres humanos. Esto se logró

midiendo la concentración de anticuerpos libres y los complejos de anticuerpo y β -amiloide en diversos tiempos durante un periodo de 19 días.

Procedimiento

- 5 Se preparó quirúrgicamente a cobayas Dunkin-Hartley macho, anestesiados con isofluorano con una cánula doble en la vena yugular. Las cobayas canuladas recibieron una infusión intravenosa de anticuerpo 6F6 (n = 6) durante 1 hora. Se administraron preparaciones de anticuerpo purificado en solución de PBS a 0,700 y 0,625 ml/kg/h, respectivamente para lograr una
- 10 dosis diana de 3 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre (60 μ l) de cada cobaya antes de la administración (0 min.) y se introdujeron en tubos de EDTA en los siguientes tiempos (durante 20 días) después de iniciar la infusión: 15, 30, 45, 60 (iv sin infusión), 90, 120, 180, 360 min, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 312, 360, 408 y 456 h.
- 15
- Se tomaron muestras grandes (0,5 ml) a las 0, 10, 96, 216, 312 y 456 h después del inicio de la infusión. Después de la última muestra de sangre el día 20, se anestesió a los animales y se extrajo la sangre. Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por ELISA. Se evaluaron los
- 20 niveles de anticuerpos libres mediante ELISA de unión de antígenos usando placas de microtitulación recubiertas con β -amiloide 1-40. Se añadieron muestras de plasma de 0, 10 h, 96 h, 196 h, 312 h y 456 h a estos pocillos y el anticuerpo monoclonal 6F6 unido se detectó usando conjugado de IgG-HRP contra ratón. Los complejos de -amiloide y anticuerpo se detectaron mediante
- 25 captura en placas recubiertas con anticuerpo policlonal específico del extremo

C de β -amiloide 42. Los complejos capturados se detectaron mediante el anticuerpo monoclonal 6F6 con conjugado de biotina contra IgG de ratón y kriptato de europio con estreptavidina.

5 Resultados

Los niveles de anticuerpos libres aumentaron rápidamente tal y como era de esperar después de la administración IV (intravenosa) pero también bajaron muy rápidamente durante el primer periodo de 24 horas. Los niveles alcanzaron un nivel estable aproximadamente a las 160h. Los resultados
10 muestran una velocidad de aclaramiento en ratón de 1,75 ml/h/kg para el anticuerpo 6F6 y un tiempo de permanencia medio (MRT) de 49,4 h.

Los niveles de complejo también aumentaron rápidamente después de la administración de anticuerpo y los niveles de complejos medios permanecieron
15 estables a ese nivel durante el resto del estudio. Sin embargo, los animales individuales mostraron una variación considerable. En algunos animales los niveles de complejo disminuyeron, en algunos animales los niveles de complejo aumentaron pero en la mayoría de los casos los niveles estuvieron estables desde aproximadamente el tiempo de 216 h en adelante. El
20 experimento mostró que pueden formarse complejos con amiloide equivalente humano *in vivo* y que el nivel de complejos no cambia durante un periodo de tiempo prolongado en plasma tras la administración de una única dosis.

Estudio de administración de 6F6 durante 4 semanas en ratones transgénicos TASTPM

Los ratones transgénicos (tg) que hiperexpresan la proteína precursora amiloide humana (hAPP) proporcionan un modelo de amiloidosis y son adecuados para estudiar la influencia de los fármacos sobre la producción, captura y deposición de amiloide. Para este estudio se usaron ratones TASTPM transgénicos que hiperexpresaban la proteína precursora amiloide humana y una forma mutante de presenilina 1 (cepa de ratones doblemente transgénicos creados por el cruce de ratones Swedish con la mutación APP695 (TAS10) con una cepa PS-1M146V (TPM) (Howlett y cols. 2008). El estudio se realizó en ratones machos y hembras de aproximadamente 10 semanas de edad.

Los animales estaban en tres grupos de tratamiento:

Grupos de tratamiento:

- (A) Animales tg se sacrificaron el día 1 sin recibir compuesto para determinar los niveles de amiloide al inicio del estudio (n=16; 9 machos, 7 hembras)
- (B) Animales tg que recibieron vehículo (PBS) mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana durante 4 semanas (n=19; 9 machos, 10 hembras)
- (C) Animales tg que recibieron 6F6 300 g por ratón mediante inyección intraperitoneal dos veces a la semana durante 4 semanas (n=19; 9 machos, 10 hembras)

25

Los animales se dividieron en 3 grupos de tratamiento iniciando el tratamiento con una semana de diferencia.

5 Las muestras de sangre se tomaron antes de la 2^a, 4^a, 6^a y 8^a dosis en 3 animales macho y 3 hembra por grupo de tratamiento mediante extracción de la vena caudal. Se prepararon muestras de plasma en EDTA de todos los grupos el día 1 (Grupo A) o 4 semanas después de la primera dosis (grupos B y C). Se tomaron los hemisferios izquierdo y derecho, se congelaron de forma ultrarrápida y se almacenaron a -80 °C hasta el posterior análisis para
10 determinar los niveles bioquímicos de amiloide. También se realizaron extracciones de la cola y se usaron para confirmar el genotipo.

15 Determinación de la carga de amiloide bioquímico en homogenados de cerebro

Se determinó el nivel de A β 1-40 y A β 1-42 en muestras de cerebro extraídas usando la tecnología ORIGEN (Igen International Inc). De forma resumida, se pesaron y extrajeron los hemisferios cerebrales en guanidina HCl 5 M
20 (Calbiochem) que contenía inhibidor de proteasa Complete TM (Roche Diagnostic) a 150 mg/ml p/v usando un mortero de mano. Los extractos se diluyeron en tampón Igen y en el ensayo se usaron diluciones a 1:10 y 1:40 clarificadas por centrifugación a 20000 g.

25 El ensayo ORIGEN empleaba Dynaperlas recubiertas con estreptavidina

(Dynal) con anticuerpo 6E10 biotinilado inmovilizado (específico para A β 1-16 humano; Signet Labs) para capturar el A β de las muestras y detectar A β unido con G210 (anticuerpo específico para A β 1-40; reactivo del laboratorio) marcado con ori-tag o 5G5 (anticuerpo específico para A β 1-42; reactivo del
5 laboratorio).

El análisis de la carga de A β 1-40 y A β 1-42 post-mortem de cada grupo mostró que no se producía una reducción de la carga de amiloide cerebral por el tratamiento con 6F6 en este estudio y mediante el procedimiento analítico que
10 se empleó aquí. No fue posible alcanzar conclusiones definitivas sobre la potencial reducción del amiloide cerebral porque el patrón del aumento de A β en el cerebro de los animales tratados con vehículo durante el transcurso del estudio era pequeño y no uniforme entre todos los animales.

15 Determinación de niveles en plasma de anticuerpo 6F6

Se evaluaron muestras de plasma en EDTA longitudinales y terminales para determinar los niveles de anticuerpos mediante ELISA. De forma resumida, las muestras se diluyeron 1:50, 1:500 y 1:5000 y se añadieron a placas de ELISA
20 con 0,5 μ g/ml de péptido A β 1-40 inmovilizado diluido en PBS. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C, se lavaron y el anticuerpo 6F6 unido se detectó usando conjugado de peroxidasa de rábano contra ratón. Las concentraciones de las muestras se determinaron usando una curva de patrones producida usando 8 concentraciones conocidas de 6F6 que variaban
25 de 0 a 30 μ g/ml.

Los resultados mostraron que a todos los ratones se les administró anticuerpo 6F6 con éxito y que las concentraciones terminales en plasma tenían un valor medio de aproximadamente 250 µg/ml. Las muestras de plasma longitudinales
5 mostraron un aumento de los niveles en plasma entre la 2ª y 4ª dosis debido a la administración repetida pero se mantuvieron a un nivel de al menos 150 µg/ml hasta el final del estudio en todos los animales muestreados.

Determinación de complejos de amiloide y anticuerpo en plasma mediante
10 inmunoprecipitación y transferencia western

Para examinar si los complejos de anticuerpo y Aβ se habían formado en este estudio *in vivo*, se investigaron las muestras de plasma para determinar la formación de complejos usando inmunoprecipitación y posterior análisis por
15 transferencia western. De forma resumida, se incubaron muestras de plasma de 15 µl y se agitaron durante 3 h a 4 °C con 10 µl de suspensión de perlas sobre proteína A sefarosa. Las perlas se lavaron 5 veces en 1 ml de PBS helado que contenía inhibidor de proteasas. Cada vez se centrifugaron las muestras durante 2 min a 2000 rpm a 4 °C. Después de lavar, las perlas se
20 volvieron a suspender en 20 µl de tampón de muestras para electroforesis que contenía DTT 0,1 M. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron como anteriormente. Después de volver a hervir el sobrenadante, las muestras se cargaron en 10% de minigeles de Bis/tris y se separaron mediante electroforesis. Los geles se transfirieron sobre una membrana de
25 nitrocelulosa, se bloquearon y se sondaron con anticuerpo 6E10 (específico

para A β 1-16 humano; Signet Labs). La detección de 6E10 unido se hizo con tinte de IR dye800 conjugado anticuerpo de cabra contra IgG de ratón (H+L) (Rockland). Las transferencias se visualizaron usando un sistema de obtención de imágenes por infrarrojos Odyssey.

5

Los resultados mostraron que el A β de bajo peso molecular podía detectarse en las transferencias que se purificaron al mismo tiempo usando el procedimiento de inmunoprecipitación. Podría concluirse que se formaron complejos de 6F6 con A β *in vivo* presentes en las muestras de plasma. La
10 intensidad de las bandas era menor en los animales hembra analizados. En general, esto confirmó que 6F6 es capaz de unirse a A β humano *in vivo* y formar complejos estables que pueden detectarse mediante transferencia western.

15 **Estudio de administración de 6F6 durante 16 semanas en ratones transgénicos para hAPP**

Se usaron ratones transgénicos que hiperexpresan hAPP(751) controlado por el promotor Thy-1 murino que expresan APP humano con las mutaciones
20 London (717) y Swedish (670/671) en niveles elevados, que producen un aumento dependiente de la edad de amiloide beta 1-40 y amiloide beta 1-42 (A β 1-40 y A β 1-42). Estos ratones desarrollan placas constituidas por deposiciones de amiloide a una edad temprana, que se inicia aproximadamente a los 4 meses. La gravedad de la patología cerebral muestra
25 una relación directa con el aumento de la edad y las deficiencias del

comportamiento.

Este estudio se realizó ciego para el investigador sin revelar la identidad del compuesto que se estaba administrando. Se asignaron ratones transgénicos hembra con una edad de 4 meses en 3 grupos (n= 15 por grupo) así como un grupo de compañeros de camada no transgénicos y se trataron una vez a la semana por vía intraperitoneal durante un periodo de tiempo de 4 meses. El grupo de los compañeros de camada y un grupo de tg que recibía la IgG de control hacían de controles. Al final del tratamiento se realizó un análisis del comportamiento (laberinto de agua de Morris, reconocimiento de objetos nuevos) y se sacrificó a los animales. Se extrajo el cerebro, CSF y el plasma sanguíneo. Se procesó un hemisferio de cada cerebro para su evaluación histológica, el segundo se congeló inmediatamente para determinar A β 1-38, A β 1-40 y A β 1-42 en las fracciones de homogenado de cerebro así como de CSF con TBS, Triton X-100, SDS y ácido fórmico (FA). Se determinó la carga de placas en el cerebro usando inmunotinción con anticuerpo contra beta amiloide 6E10 y se determinaron el área de la superficie de las placas y el número de placas y se contaron con un programa de análisis de imágenes por ordenador (Image Pro Plus, version 4.5.1.29). Se investigó la densidad de las sinapsis usando tinción con anticuerpos específicos de sinaptofisina (Neomarkers®) marcados con un anticuerpo secundario biotinilado con sistema de detección VIP (Vector®).

Grupos de tratamiento: 3 grupos de animales tg (15/grupo) y un grupo de animales C57BL6 no transgénicos (n=15):

(A) Animales tg que recibieron el compuesto 6F6 a 17 mg/kg de peso corporal

una vez a la semana (n=15)

(B) Animales tg que recibieron el compuesto mlgG2a 17 mg/kg de peso corporal (n=15)

(D) Animales tg que recibieron el compuesto 6F6 a 33 mg/kg de peso corporal
5 (n=15)

(E) Compañeros de camada no transgénicos que recibieron mlgG2a 17 mg/kg de peso corporal (n=15)

10 Determinación de la carga de amiloide bioquímico en homogenados de cerebro extraídos secuencialmente y CSF

Se extrajo CSF de los animales de los grupos de tratamiento A, B y D e inmediatamente se congeló hasta que estuvo preparado el análisis posterior con al técnica ELISA. Para los homogenados de cerebro, se homogeneizaron
15 los hemisferios congelados de los animales de los grupos A, B y D en 5 ml de solución salina tamponada con TRIS (TBS) que contenía cóctel inhibidor de proteasas. Aproximadamente la mitad de los homogenados de cerebro se congeló inmediatamente en alícuotas. La otra mitad se centrifugó a 74,500 g durante 1 hora y los sobrenadantes resultantes (= fracción de TBS), se repartió
20 en alícuotas y se mantuvo a -20 °C hasta la determinación. Los sedimentos se suspendieron en Triton X-100 (2,5 ml), se centrifugaron y los sobrenadantes se repartieron en alícuotas y se mantuvieron a -20 °C. Estas etapas se repitieron con SDS (2,5 ml). Los sedimentos de la fracción de SDS se suspendieron en 70% de ácido fórmico (0,5 ml) antes de la posterior centrifugación. Los
25 sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con TRIS 1 M (9,5 ml) se repartieron

en alícuotas y se mantuvieron a -20 °C. Se usó CSF así como las muestras de las cuatro fracciones de cerebro para la determinación de A β 38, A β 40 y A β 42 usando un kit disponible comercialmente (Mesoscale Discovery Abeta 3-plex kit n.º K15148E usando Sector Imager MS2400), siguiendo las instrucciones
5 del fabricante. Se calcularon los valores cerebrales en términos de ng de A β por g de cerebro seco, los valores de CSF se calcularon en términos de pg de A β por ml.

En la fracción de TBS, los niveles de A β de los animales del grupo B eran los
10 más bajos para las tres especies de amiloides. Para A β 42 este aumento de los grupos de tratamiento con 6F6 A y D fue significativo para el grupo de control B ($p < 0,05$ comparado con el grupo A y $p < 0,001$ comparado con el grupo D) pero no fue significativo para A β 38 y A β 40. En las fracciones con Triton X-100 los niveles medios de A β 42 también aumentaron significativamente en los
15 grupos de tratamiento con 6F6 A ($p < 0,05$) y D ($p < 0,01$) comparados con el grupo de control B. Los niveles de A β 40 de los grupos B y D no difirieron de forma significativa, mientras que los del grupo A todavía estaban significativamente aumentados con respecto al grupo de control B ($p < 0,05$). Aunque no fue significativo, se observó un aumento de A β 38 en el grupo de
20 tratamiento con 6F6 A comparado con el grupo de control B pero el grupo de tratamiento con 6F6 D disminuyó ligeramente comparado con el grupo de control B. El A β unido e insoluble en agua, medido en la fracción de SDS y FA era significativamente mayor en los cerebros de los animales del grupo de tratamiento con 6F6 A comparado con los grupos B (A β 38 y A β 42) o D (A β 38
25 y A β 40). El grupo de control B y el grupo de tratamiento con 6F6 D no

difierieron significativamente.

En las muestras de 6F6 no se observaron diferencias significativas entre los grupos para los niveles de A β 38 y A β 40. Los niveles de A β 38, A β 40 y A β 42
5 eran ligeramente menores en los animales del grupo de control B comparados con el grupo de tratamiento con 6F6 A. Los niveles de A β 42 en CSF de los animales del grupo de tratamiento con 6F6 D estaban significativamente aumentados comparados con un grupo de control B ($p < 0,05$) lo que
10 posiblemente indica la movilización de A β 42 soluble por secuestro al CSF o indirectamente por el flujo sanguíneo.

Determinación de la densidad de las sinapsis

Por cada animal se tiñen tres cortes con un anticuerpo contra sinaptofisina
15 (1:200; Neo Markers; n.º de Cat. RM9111-SO) y anticuerpo secundario biotinilado (1:200; Vector Laboratories; n.º de Cat. PK-6101) seguido de revelado con VIP (kit sustrato para peroxidasa; n.º de Cat. SK4600). Para determinar la densidad de las sinapsis media individual, se evalúan tres imágenes por región (capa granular de las CA1, CA3 del hipocampo y hoja
20 media de la circunvolución dentada (DGmb)) y los cortes se evaluaron en un procedimiento de medición basada en el macro. Durante el experimento de macro, las imágenes se contrastan del mismo modo y se cuentan las sinapsis por encima de un umbral constante. Las sinapsis únicas y sucesivas se cuentan por separado con las restricciones de uso del tamaño. El área total de
25 las sinapsis en sucesión se divide entre el tamaño medio de las sinapsis

únicas. El recuento de sinapsis total se calcula con la siguiente fórmula:

$$\sum \text{Sinapsis} = \text{n.º de sinapsis distintas} + \frac{\text{Área de sinapsis en sucesión}}{\text{Área media de sinapsis separadas}}$$

5

Además, el área de la imagen se corrige teniendo en cuenta el ruido de fondo teniendo en cuenta una reducción del área de los vasos sanguíneos y la suma de la sinapsis se considera relativa al área de imagen total reducida por el área de los vasos sanguíneos.

10

La medición obtenida de los recuentos sinápticos en la región CA1, CA3 y GDmb de los cortes del hipocampo cerebral de los grupos de tratamiento A, B y D permaneció sin cambios entre los grupos de tratamiento.

15 Determinación de los niveles longitudinales en plasma de beta amiloide total y no unido (libre)

Se tomaron muestras de sangre *in vivo* antes de iniciar el tratamiento (día 0) y de nuevo las semanas 3, 6, 9 y 12 mediante toma de muestras mandibulares de la vena/arteria facial. Las muestras de sangre se introdujeron en EDTA y viales sin recubrimiento para obtener el plasma. Todas las muestras de plasma se congelaron y se almacenaron hasta su análisis.

20

Los niveles de amiloide no unido (libre) y los niveles de amiloide total (Aβ no unido y formando complejos con anticuerpo) se determinaron usando la estación de trabajo Gyrolab™. Se usó el mAb murino 6F6 biotinilado como

25

reactivo de captura para el ensayo de β -amiloide libre y un anticuerpo específico contra β -amiloide biotinilado en el extremo N (reactivo del laboratorio) como reactivo de captura para el ensayo de β -amiloide total. Ambos reactivos de captura se capturaron en la columna de captura Gyros Bioaffy CD que contenía una matriz recubierta con estreptavidina. Se añadieron los anticuerpos de captura a una concentración de 700 nM. Para ambos ensayos se usó 4G8 marcado con Alexa 647 (específico para el epítipo 17-24 de β -amiloide) a una concentración de 12,5 nM para la detección. Para cuantificar la cantidad de β -amiloide de las muestras se preparó una curva con patrones de A β 1-42 (Innogenetics A β 1-42) proporcionando un rango dinámico de 31,25 pg/ml a 20000 pg/ml. La dilución la curva de patrones de A β 1-42 y las muestras de plasma se realizó en plasma humano sin β -amiloide. Los datos se analizaron usando el programa inherente al aparato y después se representaron en Excel.

Los niveles totales de β -amiloide aumentaron más de 2000 veces para la semana 3 (el primer tiempo) tanto en los grupos de tratamiento con 6F6 a 17 mg/kg y 33 mg/kg. El grupo de tratamiento a 33 mg/kg presentaba un nivel ligeramente mayor de nivel de β -amiloide total observado durante la duración del estudio pero no presentaba una correlación directa con el mayor nivel de dosis posible, lo que indicaba que el efecto estaba alcanzando la saturación. Se observó que los niveles de β -amiloide libre para los grupos de tratamiento con 6F6 era el nivel de ruido de fondo que mostraban los ratones no transgénicos en el primer tiempo después del tratamiento (3 semanas), presumiblemente debido a que la mayoría sino todo el β -amiloide detectado

con este ensayo estaba formando complejos de anticuerpo y β -amiloide . Sin la intervención del tratamiento, los niveles iniciales de beta amiloide para los ratones transgénicos era aproximadamente 6 veces mayores que los de los ratones de control no transgénicos.

5

Determinación de la carga de las placas usando tinción con 6E10

De las mitades de cerebro de los 18 ratones Tg (6 de del grupo de Tg A; B y D) se preparó un número suficiente de cortes por cerebro para cuantificar los depósitos amiloides. La inmunoreactividad de 6E10 se evaluó cuantitativamente en el hipocampo y el córtex. Se cortaron sagitalmente 15 secciones por capa (en total 5 capas que corresponden a las figuras 104 a 105, 107 a 108, 111 a 112, 115 a 116 y 118 a 119 de acuerdo con el atlas de morfología "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin, 2ª Edición), cada una de 5 μ m de grueso (Leica SM 2000R). Los tejidos de todos los animales transgénicos investigados se manejaron exáctamente del mismo modo para evitar sesgos debidos a la variación de este procedimiento.

Las deposiciones de amiloide y la carga de placas se determinaron usando el anticuerpo monoclonal 6E10 (Signet®) dirigido contra la posición 1-17 del péptido β -amiloide humano. Las áreas de la región medida del hipocampo y del córtex eran constantes en todos los cerebros investigados, lo que excluye los efectos negativos sobre el tejido de las etapas de tinción inmunohistoquímica (por ejemplo encogimiento, diferentes circunstancias de corte, etc) e indica que no se produjo atrofia por el tratamiento. Los datos de la

carga de placas se relacionaron con el tamaño de la región individual del corte para poder manejar los artefactos, plegamientos o trozos que faltaran. El tratamiento con una dosis elevada de 6F6 (grupo D), produjo un descenso significativo del porcentaje del área de las placas del hipocampo y del córtex comparada con el tratamiento con 6F6 a dosis bajas (grupo A; ANOVA: córtex y hipocampo: $p < 0,01$) y grupo de control B (Figura 2). Se dio la misma tendencia en el número de placas por mm^2 que de nuevo fue menor en el grupo de tratamiento con 6F6 D comparado con el grupo de control B (prueba t: córtex: $p = 0,093$) y grupo de tratamiento con dosis baja con 6F6 A (prueba t: hipocampo: $p = 0,051$; Figura 3). El tamaño medio de las placas permaneció sin cambios entre todos los grupos de tratamiento.

Demostración de amiloidosis en los ojos de ratones sin complemento H: un modelo de AMD "seca".

Animales

Se alojaron ratones de diez semanas, 3 meses, 6 meses, 9 meses y un año de edad *cfh*^{-/-} ($n=6$) (cruzados con el historial genético C57BL/6 durante más de 10 generaciones) y ratones de la misma edad con C57BL/6 normal ($n=6$) en un entorno de temperatura controlada con un ciclo de 12 horas de día (160 lux) y noche y se mantuvieron con una dieta de laboratorio normal (se les administró pienso de laboratorio a voluntad). Los ratones se anestesiaron (0,75 ml de Ketamina, 0,5 ml de Domitor, 0,75 ml de agua estéril a 0,2 ml/100 g, i.p. suplementado según fuera necesario) y se dilataron las pupilas con tropicamida tópica al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 2,5% 10-15 minutos antes de la obtención de imágenes con cSLO. Antes de cada secuencia de

obtención de imágenes, se introdujeron gotas de hidroxipropilmetilcelulosa (0,3%) en el ojo para evitar la desecación. Todos los procedimientos experimentales cumplieron y se realizaron según la normativa de la United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act de 1986.

5

Obtención de imágenes de la retina

La obtención de imágenes se realizó en ratones de 3 meses, 6 meses y 12 meses *cfh*^{-/-} (n=12) y ratones de control de la misma edad (n=6) tal como se describe en detalle más adelante. Se adquirieron las imágenes de retina de alta resolución y alto contraste con un oftalmoscopio de láser de barrido confocal tal como se describe más adelante. De forma resumida, se realizó una obtención de imágenes por reflectancia usando haces de láser de 488 y 820 nm. Las imágenes de autofluorescencia y de angiografía con fluoresceína de la retina de los ratones se registraron usando 488 nm. La excitación y el filtro de corte de emisiones estándar integrado con el borde de barrera (valor de 50% de la transmisión) a 498 nm.

Los ratones se anestesiaron (0,75 ml de Ketamina, 0,5 ml de Domitor, 0,75 ml de agua estéril a 0,2 ml/100 g, i.p. suplementado según fuera necesario) y se dilataron las pupilas con tropicamida tópica al 1% y clorhidrato de fenilefrina al 2,5% 10-15 minutos antes de la obtención de imágenes. Antes de cada secuencia de obtención de imágenes, se introdujo una gota de hidroxipropilmetilcelulosa (0,3%) en el ojo para evitar la desecación. Las imágenes de alta resolución y alto contraste de la retina se adquirieron *in vivo* con un oftalmoscopio de láser de barrido confocal (Heidelberg Retina

Angiograph, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) usando una modificación de los procedimientos descrito (Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF (2006) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 626-633). De forma resumida, el diámetro del orificio se redujo a 100 μm para
5 mejorar la resolución axial y se aumentó la potencia del láser para mejorar la proporción entre señal y ruido. La potencia medida en la pupila del ratón era de 1400 W a 488 nm. Se proporcionó al ratón una lentilla de contacto planocóncava especialmente diseñada y se proporcionó potencia óptica usando un objetivo de microscopio de 50 aumentos con una distancia de
10 trabajo muy grande, que mejoró la potencia de resolución óptica y permitió la detección de estructuras microcapilares desde un tamaño de 3 μm de diámetro.

Se registraron cortes de imágenes tomográficas en las que el plano axial se movía secuencialmente a intervalos de 15 μm , del humor vítreo a la esclerótica
15 y de central a periférico para visualizar la vasculatura retiniana del plexo primario al plexo exterior. Todas las secuencias de imágenes se capturaron a 8,9 Hz, campo de visión de 10^0 , y se digitalizaron en forma de archivos de imágenes de 8 bites y 768 x 768 píxeles, que producía una resolución de imágenes lateral de 1,2 μm /píxel. La resolución axial medida en el ojo de ratón
20 era de 5-8 μm .

Las diferencias entre los animales *cfh*^{-/-} y los de control con la misma edad en el número de depósitos autofluorescentes subretinianos al nivel del RPE se analizaron aplicando la prueba t de Student no pareada a los datos de las
25 imágenes SPSS (Chicago, IL).

Histología e inmunohistoquímica

- De forma resumida, los animales se anestesiaron profundamente con ketamina y dormitor y después se perfundió a los ratones ratones *cfh*^{-/-} de diez semanas (*n*=6), 3 meses (*n*=3), 6 meses (*n*=3) 9 meses (*n*=3) y ratones *cfh*^{-/-} de 1 año de edad (*n*=6) con PBS 0,1 M, seguido de paraformaldehído al 4% (en PBS 0,1 M, a pH 7,2). Se sacaron los ojos y se introdujeron en paraformaldehído al 4% antes de la crioprotección en solución de sacarosa al 30% (en tampón de PBS 0,1 M) y se dejó durante 24 h a 4 °C. El cristalino se eliminó mediante una incisión en la córnea y los ojos se congelaron rápidamente en compuesto OCT y se seccionaron a un grosor de 10 µm para el análisis inmunohistoquímico, véanse los detalles más adelante. La retina neural y las coroides de los animales seleccionados se separaron y se montaron planas de forma independiente.
- 15 Se incubaron secciones oculares de ratones *cfh*^{-/-} (*n*=20) y ratones de control de la misma edad (*n*=20) se incubaron con anticuerpos primarios, (Tabla 5) seguido de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia y DAPI para teñir los núcleos, véanse los detalles más adelante.
- 20 La inmunohistoquímica se realizó a temperatura ambiente y se llevó a cabo en secciones de criostato de 10 µm de grueso de los ojos fijados en 4% de paraformaldehído. Las secciones de retina se bloquearon durante 1 hora suero de burro normal al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M, a pH 7,4, con 0,3% de Triton X-100, y se incubó toda la noche con anticuerpos
- 25 primarios, diluidos con suero de burro normal al 1% en PBS 0,1 M con 0,3% de

Triton X-100. Las diluciones de cada anticuerpo primario eran las que se describen más adelante. La exposición a anticuerpo primario se continuó con un lavado y, cuando era necesario, se conjugaron fluorescentemente a anticuerpos secundarios apropiados (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., anticuerpo de burro contra sc-2099 de ratón en PBS con 0,3% de Triton y 2% de suero normal (dilución 1:100, mismos diluyentes que en los primarios) y los cortes se expusieron durante 2 horas, (FITC Santa Cruz, Biotechnology, Inc., anticuerpo de burro contra sc-2099 de ratón). Los controles negativos estaban constituidos por anticuerpo del mismo isotipo pero sin relación o se omitía el anticuerpo primario. Los núcleos se tiñeron posteriormente con 0,5 ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (1 µl de solución madre de DAPI a 5 ml de PBS 0,1 M; Sigma-Aldrich) durante 1 minuto. Después los cortes se lavaron varias veces con PBS 0,1 M seguido de cuatro lavados en solución salina de tampón Tris (a pH 7,4) y finalmente se montaron cubres de vidrio en VECTASHIELD (Vector Laboratories).

Los cortes se observaron y las imágenes se capturaron o bien en un microscopio confocal de barrido por láser (Leica SP2; Leitz) a 8 bites/canal y 1024x1024 píxeles, o un microscopio de campo brillante para Epi-fluorescencia (Olympus BX50F4, Olympus, Japón), donde los datos se capturaron en forma de imágenes a color de 24 bites a una resolución de 3840x3072 px usando una cámara Nikon DXM1200 (Nikon, Tokio, Japón).

Anticuerpos primarios disponibles comercialmente

Se usó C3 (anticuerpo de cabra contra ratón conjugado con FITC, dilución

1:100; ICN Biomedicals) para teñir los cortes de retina a las diluciones que se indica.

Anticuerpos contra β -amiloide que se usaron en este trabajo:

- 5
- (1) Ab policlonal de conejo específico para amiloide beta de roedor Covance SIG-39153, recomendado para usar en cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/250,
- (2) Ab monoclonal de ratón, (IgG2b), Calbiochem NE1002 (4G8) que reconoce tanto amiloide beta humano como de ratón, recomendado para usar cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/100 – 1/1000, (es necesario el pretratamiento con ácido fórmico),
- 10
- (3) Ab policlonal de conejo Abcam ab2539 que reconoce tanto amiloide beta humano como de ratón , recomendado para usar en cortes embebidos en parafina IHC a una dilución de 1/100, (requiere recuperar el antígeno por medios térmicos antes del procedimiento de tinción IHC),
- 15

Anticuerpos secundarios disponibles comercialmente

20

Tabla 5: Anticuerpos secundarios disponibles comercialmente que se usaron en este trabajo

Ab de burro contra IgG de ratón con FITC	Santa Cruz Biotech inc.	sc-2099	1:300
Ab de burro contra IgG de conejo con FITC	Santa Cruz Biotech inc.	sc-2090	1:300
Fragmento de Ab de cabra contra IgG de ratón Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11017	1:2000

Detección de depósitos drusenoides en ratones $cfh^{-/-}$.

Los depósitos autofluorescentes pueden detectarse en la retina de ratones $cfh^{-/-}$ viejos. El lípido fluorescente, los depósitos de tipo drusenoide pueden
5 detectarse primeramente aproximadamente a las 14 semanas de edad en los ratones $cfh^{-/-}$ y su presencia aumenta con la edad y está localizada en el espacio subretiniano (lado apical de RPE). Estos depósitos también están presentes en los ratones de tipo silvestre, pero con un grado significativamente menor. Por ejemplo, una imagen por cSLO de la retina de un ratón $cfh^{-/-}$ de 6
10 meses de edad identifica algunos puntos blancos autofluorescentes en un fondo gris y estos pueden observarse en un frotis de retina *in vitro* para IHC con aumentos de 10x y 40x, como depósitos autofluorescentes fácilmente identificables en el canal verde (FITC). Hay grandes variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia entre los depósitos autofluorescentes,
15 (no se muestran datos).

Cuando los cortes de la retina de los ratones $cfh^{-/-}$ se examinan mediante autofluorescencia IHC, pueden observarse depósitos de tipo drusenoide asociados a los sitios de deposición de complemento C3 en el espacio
20 subretiniano de la parte apical de las células de RPE. Esto puede observarse en los ratones $cfh^{-/-}$ de 12 meses de edad (no se muestran datos).

Análisis de ojos de ratones $cfh^{-/-}$ con Ab contra amiloide beta disponibles comercialmente.

25 Se usaron cortes disponibles comercialmente de cerebros de Alzheimer

humano cuya tinción para A β dio positivo (Abcam ab4582), para comprobar la reactividad cruzada de tres Ab contra amiloide beta disponibles comercialmente que se muestran en la Tabla 6.

5 El procedimiento que se usó para ello era:

Para cortes de cerebro en parafina:

1. Xileno - 10 minutos
2. 100% de etanol - 8 minutos
3. 95% de etanol - 5 minutos
- 10 4. Agua destilada - 5 minutos
5. Recuperación de antígenos;
 - Ab2539 HIER con tampón de citrato
 - NE1002(4G8) - 70% de ácido fórmico
 - SIG-39153

15

Para los cortes en parafina y congelados;

6. Lavar con PBS, 3 veces durante 5 minutos cada uno
7. Bloquear con 5% de suero de burro normal durante 1 hora
8. Lavar brevemente con PBS
- 20 9. Aplicar anticuerpo primario a;
 - Ab 2539 - 1:100
 - NE1002 (4G8) - 1:200
 - SIG-39153 - 1:250
- Incubar toda la noche
- 25 10. Lavar con PBS, 3 veces a 5 minutos cada una

11. Aplicar anticuerpo secundario a
- Para ab2539 – Ab sc-2090 1/100
- Para NE1002 – Ab sc-2099 1/100
- Para SIG-39153 - Ab sc-2090 1/100
- 5 Incubar durante 1 hora
12. Lavar con PBS, 3 veces durante 5 minutos cada uno
13. DAPI durante 1 minuto
12. Lavar con PBS, 3 veces
13. Lavar con TBS, 4 veces a 5 minutos cada una
- 10 14. Montar, colocar un cubre y sellar.

Tal y como se esperar, solo los anticuerpos primarios que podían reaccionar de forma cruzada con beta amiloide humano (NE1002 [4G8], y ab2539), dieron una detección positiva de las placas de amiloide beta humanas en el tejido de

15 cerebro de Alzheimer humano (no se muestran datos).

La detección de amiloide beta en los ojos ratones cfh^{-/-} viejos (>1 año de edad) y de 10 semanas de edad usando Ab disponibles comercialmente.

20

Tabla 6: Anticuerpos primarios contra amiloide beta que se usaron en este estudio

Anticuerpo policlonal de conejo contra beta amiloide	AbCam Ltd.	ab2539	1:100
mAb de ratón contra β-amiloide	Calbiochem Inc.	NE1002	1:100
Anticuerpo policlonal purificado contra Aβ de roedor	Covance Inc.	SIG-39153	1:100

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Secar al aire los portas durante varias horas
2. Lavar 3 veces
- 5 3. Bloquear con 5% de NDS durante 1 hora
4. Preparar los anticuerpos primarios de la Tabla 6 de la forma siguiente;
 - a. SIG39153 - 1:250
 - b. NE1002 (4G8) - 1:200
 - c. Ab2539 1:500
- 10 5. Lavar brevemente e incubar con los anticuerpos primarios toda la noche
6. Lavar 3 veces
7. Preparar los anticuerpos secundarios de la forma siguiente;
 - a. contra conejo con FITC
 - b. contra ratón con FITC
- 15 Incubar durante 1 hora
8. Lavar 3 veces
9. Aplicar DAPI durante 1 minuto
10. Lavar 3 veces con PBS
11. Lavar 4 veces con TBS
- 20 12. Montar, colocar un cubre y sellar

Se examinó tejido ocular inicialmente fijado de ratones *cfh*^{-/-} de la misma edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre, (C57Bl/6) de 12-13 meses de edad usando los tres anticuerpo primarios contra β -amiloide

25 disponibles comercialmente, (Ab), descritos anteriormente. Cada Ab primario

se detectó usando el Ab secundario relevante marcado con fluorescencia. Para el Ab SIG39153, no fue posible detectar ninguna señal en ninguno de los tejidos, a pesar de seguir el protocolo recomendado por el fabricante, (como en las muestras de cerebro descritas anteriormente), (no se muestran datos). Sin
5 embarog, fue posible detectar amiloide beta específicamente en la retina de ratones *cfh*^{-/-} viejos, (pero no en los compañeros de camada de tipo silvestre), usando los dos anticuerpos primarios contra β -amiloide beta disponibles comercialmente. Un ejemplo de estos datos se muestran en la Figura 4, en la que el panel (A) muestra tejido retiniano de un ratón de tipo silvestre viejo y el
10 panel (B) muestra tejido de un ratón *cfh*^{-/-} viejo ambos sondados con ab2539 como Ab primario; y el panel (C) muestra tejido retiniano de un ratón de tipo silvestre viejo y el panel (D) muestra tejido de un *cfh*^{-/-} viejo ambos sondados con NE1002 (4G8) como Ab primario. Los datos demuestran que amiloide-beta se deposita en torno a la membrana de Bruch específicamente en ratones
15 *cfh*^{-/-} viejos. La señal positiva de reactividad cruzada de los anticuerpos contra amiloide beta depositado en la interfaz entre el RPE / y la membrana de Bruch puede observarse en forma de una franja blanca intensa señalada por las flechas blancas de la Figura 4 (B) y (D). También pueden observarse algunos depósitos amiloides en el área de la capa de las fibras nerviosas y las células
20 ganglionares del ojo de los ratones *cfh*^{-/-} por ejemplo, la señal blanca marcada con una flecha blanca en la parte superior de la Fig. 4 (B)

Posteriormente, se examinó tejido ocular retiniano fijado de ratones *cfh*^{-/-} de 10 semanas de edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre de la
25 misma edad, (C57Bl/6) usando anticuerpos primarios NE1002 (4G8) y ab2539

contra β -amiloide. De nuevo, el amiloide beta podía detectarse específicamente en la retina de los ratones *cfh*^{-/-}, pero no en los compañeros de camada de tipo silvestre (no se muestran datos). Los datos demuestran que la deposición de amiloide beta se produce el 10% de la retina en los ratones *cfh*^{-/-} de 10 semanas de edad (n=3), (no se muestran datos). La deposición se produce principalmente en el lado basal de la capa epitelial del pigmento retiniano (RPE) y aparece asociada a depósitos laminares basales, (no se muestran datos). Obsérvese que la deposición de amiloide beta a las 10 semanas de edad es similar al tiempo en el que se deposita el 'drusenoide' autofluorescente, y los depósitos de complemento C3 aparecen primero en el ratón *cfh*^{-/-}.

Reactividad cruzada de 6F6 con amiloide beta en la retina de los ojos de ratones *cfh*^{-/-}

15

Anticuerpos primarios que se usaron en este estudio.

- (i) Ab monoclonal 6F6 de ratón, IgG2a,
- (ii) Ab monoclonal de ratón isotipo IgG2a de control, (reactivo del laboratorio específico para el antígeno citosina desaminasa,
- (iii) Ab monoclonal de control de isotipo de ratón IgG2a, kappa [MOPC-173], (ab18413, Abcam), clon derivado de mieloma en Balb/c de especificidad desconocida

25 Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Secar al aire los portas durante varias horas
2. Lavar con 1XPBS, 3 veces a 5 minutos cada una
3. Bloquear con 5% de suero de burro normal en 0,3% de Triton X-100 en PBS, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- 5 4. Preparar el anticuerpo primario, diluyendo con 1% de suero de burro normal en 0,3% de Triton X-100 en PBS
 - a. 6F6 monoclonal de ratón contra amiloide Beta i) – 1:1000, 1:2000 y 1:4000
 - b. IgG2a de ratón de control ii) 1:1000 ,1:2000 y 1:4000
- 10 5. Aplicar el anticuerpo primario e incubar toda la noche a temperatura ambiente
- Al día siguiente;
- 15 1. Lavar con 1X PBS, 3 veces a 5 minutos cada una
2. Preparar los anticuerpos secundarios diluyendo en 1% de suero de burro normal en 0,3% de Triton X-100 en PBS
 - a. Alexa Fluor 488 de cabra contra ratón (1:2000)
- 20 3. Lavar con 1 X PBS, 3 veces a 5 minutos cada uno
4. Aplicar DAPI, 1:5000 en PBS e incubar durante 1 minuto en un lugar oscuro
5. Lavar con 1 X PBS, 3 veces durante 5 minutos cada una
- 25 6. Lavar con 1XTBS, 4 veces a 5 minutos cada una

7. Montar con Vectashield, colocar un cubre y sellar.

Se examinó tejido ocular inicialmente fijado de ratones *cfh*^{-/-} de la misma edad y controles compañeros de camada de tipo silvestre, (C57Bl/6) de 12-13
5 meses de edad como se describe anteriormente. Aunque apareció reactividad cruzada de 6F6 en un área similar de la retina a la que se detectó mediante los Ab contra amiloide beta comerciales, se produjo una reactividad cruzada similar con el anticuerpo de control aunque parte de esto puede deberse a una reactividad cruzada de ruido de fondo del Ab secundario solo. También pudo
10 observarse alguna tinción de ruido de fondo en las muestras de tipo silvestre.

Para resolver la tinción de fondo descrita anteriormente, se repitió el experimento, pero el anticuerpo secundario se cambió de un Ab contra IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488, a una molécula marcada con FITC.
15 También el anticuerpo primario de control se cambió a un control de isotipo (iii) disponible comercialmente.

El procedimiento que se usó para este experimento era:

- 20 Secar al aire los portas durante varias horas
Lavar con 1XPBS, 1 vez a 5 minutos
Bloquear con 5% de suero de burro normal en 0,3% de Triton X-100 en PBS, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
Preparar el anticuerpo primario, diluyendo con 1% de suero de burro normal en
25 0,3% de Triton X-100 en PBS

a) ab18413 contra IgG2a de ratón, Kappa 1:100

Lavar brevemente

Aplicar el anticuerpo primario e incubar toda la noche a temperatura ambiente

Al día siguiente;

5 Lavar con 1X PBS, 3 veces a 5 minutos cada una

Preparar los anticuerpos secundarios diluyendo en 1% de suero de burro normal en 0,3% de Triton X-100 en PBS

b) Ab de burro contra ratón con FITC (1:300)

Aplicar el anticuerpo secundario e incubar durante 1 hora a temperatura

10 ambiente

Lavar con 1 X PBS, 3 veces a 5 minutos cada uno

Aplicar DAPI, 1:5000 en PBS e incubar durante 1 minuto en un lugar oscuro

Lavar con 1 X PBS, 3 veces durante 5 minutos cada una

Lavar con 1XTBS, 4 veces a 5 minutos cada una

15 Montar con Vectashield, colocar un cubre y sellar.

Un ejemplo de los datos con el procedimiento de tinción anterior se muestra en la Figura 5. El panel (A) muestra los datos obtenidos usando 6F6 como

20 *cfh*^{-/-} viejo y el panel (B) muestra los datos obtenidos usando un control de isotipo (iii) como primario, (a una dilución p/v similar a la de 6F6), para teñir un corte de la retina de un ratón *cfh*^{-/-} viejo (control negativo de *cfh*^{-/-} comercial marcado), y el panel (C) muestra los datos obtenidos usando 6F6 como

25 de control de tipo silvestre de la misma edad y el panel (D) muestra los datos

obtenidos usando el control de isotipo (ii) (control negativo de $cfh^{-/-}$ marcado) como primario a una dilución de 1 en 4000 para teñir un corte de la retina de un ratón $cfh^{-/-}$ viejo.

- 5 Los datos confirman que 6F6 es capaz de detectar específicamente amiloide beta depositado en la retina de ratones $cfh^{-/-}$, (Fig. 5 A), no presentes en los ratones de tipo silvestre en de la misma edad, (Fig. 5 C). La especificidad de 6F6 se confirmó por la completa ausencia de tinción usando un control de isotipo disponible comercialmente como primario, a una dilución de p/v similar a la de 6F6, (Fig. 5 B). Los datos obtenidos usando otro anticuerpo de control de isotipo del laboratorio (ii) a una dilución de 1 en 4000 (Fig. 5 D), sugirieron una tinción retiniana específica en los ratones $cfh^{-/-}$. Sin embargo, esto puede explicarse por la especificidad de este anticuerpo del mismo isotipo dado que la citosina desaminasa es un marcador de la descomposición celular que bien podría producirse en la retina de ratones $cfh^{-/-}$ viejos. En retrospectiva esta no fue una elección apropiada para el control de un Ab específico de isotipo en este experimento.

20 **Reactividad cruzada en el tiempo de amiloide en la retina de los ojos de ratón $cfh^{-/-}$ a 6F6 y 4G8.**

- Se analizaron de forma similar ratones C57Bl/6, (de tipo silvestre) y $cfh^{-/-}$ de la misma edad mediante inmunohistoquímica en tiempos intermedios entre los de las 10 semanas y los 12 meses: 3 meses de edad ($n=3$) 6 meses de edad ($n=3$) y 9 meses de edad ($n=3$). El análisis se realizó usando o bien 6F6 o

Calbiochem NE1002 (4G8) como anticuerpo de detección primario. A los tres meses de edad podía observarse poca diferencia entre los ratones de tipo silvestre y *cfh*^{-/-} a nivel macro. Sin embargo, para los seis meses de edad: era posible detectar claramente depósitos amiloides alrededor del borde de la membrana de Bruch y las células del epitelio pigmentario retiniano (RPE) en los ratones *cfh*^{-/-} pero no en los ratones de control de tipo silvestre de la misma edad, (no se muestran datos). En el tiempo de los seis meses, la tinción usando 4G8 parecía cubrir todo el borde entre el RPE y la BM, mientras que la tinción similar usando 6F6 como anticuerpo primario era más puntual, (no se muestran datos). En el tiempo de los seis meses de edad se observó una clara distinción por IHC del nivel de los depósitos amiloides en la retina de los ratones *cfh*^{-/-} comparada con la de los controles de tipo silvestre de la misma edad.

En resumen, los ratones *cfh*^{-/-} representan un modelo rápido de amiloidosis en el ojo, especialmente en la retina y esto podría estar muy relacionado con el modelo de fenotipo de ADM "seca". Los ratones representarían un buen modelo para el análisis del efecto de los Ab terapéuticos contra amiloide beta como 6F6 para amiloide beta en la retina.

20

Demostración de la capacidad de 6F6 de interferir con la unión de amiloide beta a factor de complemento I.

Los datos recientemente publicados que muestran la interacción directa entre amiloide beta y el factor de complemento I, (CFI), la "pareja" y el cofactor para

el factor de complemento H, (CFH), (Wang, J. y cols., 2008), podría ayudar a explicar la rápida deposición de amiloide beta en la retina de los ratones *cfh*^{-/-}. En ausencia de CFH, amiloide beta sería libre de unirse a cualquier CFI "desemparejado" de la retina del ratón (Wang, J. y cols., 2008, datos sin publicar). Para demostrar que el anticuerpo terapéutico contra β -amiloide, 6F6, o un equivalente humanizado podría interferir con la interacción entre amiloide beta y CFI mediante la unión a amiloide beta; podría realizarse una serie de experimentos similares a los descritos por Wang, J. y cols., 2008. El efecto de la preincubación de 6F6 con preparaciones disponibles comercialmente de proteína amiloide beta, (por ejemplo del Peptide Institute), sobre su capacidad de unirse a la proteína CFI disponible comercialmente, (Quidel Corporation), en presencia y ausencia de proteína CFH disponible comercialmente, (Quidel Corporation) podría determinarse tal como se ha descrito, (Wang, J. y cols., 2008, páginas 716-717), y analizarse o bien mediante estudios de coinmunoprecipitación estándar y/o mediante análisis por BiaCore. De forma similar, podría determinarse la capacidad del anticuerpo 6F6 de alterar un amiloide beta preformado: complejo de CFI en presencia y ausencia de CFH podría evaluarse mediante estudios de coinmunoprecipitación y/o mediante análisis por BiaCore.

20

De forma similar, el efecto de la preincubación de 6F6 con preparaciones disponibles comercialmente de proteína amiloide beta, (por ejemplo del Peptide Institute), sobre su capacidad de afectar a la función de la proteína CFI disponible comercialmente, (Quidel Corporation), en presencia y ausencia de proteína CFH disponible comercialmente, (Quidel Corporation) podría medirse

25

usando un ensayo de escisión de C3b de complemento, (Quidel Corporation) tal como se ha descrito, (Wang, J. y cols., 2008, página 717), y analizarse mediante un SDS PAGE estándar. De forma similar, podría determinarse la capacidad del anticuerpo 6F6 de alterar un amiloide beta preformado: complejo
5 de CFI en presencia de CFH y por lo tanto regenerar la función de escisión de C3b al complejo de CFI/CFH tal como se ha descrito, (Wang, J. y cols., 2008, página 717), y analizarse mediante un SDS PAGE estándar.

Se sugirió que los resultados del estudio *in vitro* recientemente publicado
10 apoyaban la hipótesis de que el amiloide beta activa el sistema de complemento I del drusen bloqueando la función del factor de complemento I provocando una inflamación crónica de menor grado en los tejidos subretinianos; relacionando así cuatro de los factores asociados al desarrollo de la AMD: inflamación, activación de complemento, depósito de amiloide beta
15 y drusen, (Wang, J. y cols., 2008). Anteriormente nunca se habían documentado estos indicios directos del efecto de amiloide beta en la activación de la ruta de complemento alternativa puede potencialmente competir con el factor de H alternativo por la unión al factor de complemento I, (Wang, J. y cols., 2008). La interferencia con el efecto negativo de amiloide
20 beta sobre el aclaramiento de los componentes C3 de complemento mediante la administración terapéutica de un anticuerpo tal como 6F6 podría constituir un mecanismo de acción novedoso para detener o invertir la AMD.

Detección de la deposición de amiloide beta en ojos humanos viejos usando tinción con tioflavina T y reactividad cruzada con 6F6.

Se obtuvieron muestras de tejido ocular de donante humano de Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido. La primera muestra
5 obtenida fue la de un hombre blanco de 65 años de edad, (Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido). Los ojos se fijaron y procesaron tal como se ha descrito anteriormente y los cortes se sometieron a tinción con tioflavina T, (Sigma T3516), usando un protocolo publicado anteriormente, (Anderson y cols., Exp Eye Res (2004), 78; 243-256; Levine, H,
10 Methods in Enzymology (1999), 309; 274-284. Los datos de tinción con tioflavina T generados con el tejido ocular mostraron una señal fluorescente de amiloide beta unida a tioflavina T que podía observarse en forma de una tenue mancha blanca en torno a los depósitos laminares basales y Drusen en torno a la interfaz entre el RPE y la membrana de Bruch en la retina exterior humana
15 del tejido ocular.

Se obtuvieron muestras adicionales de tejido ocular de donante humano del Moorfields Eye Bank, Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido, que incluían las de un hombre de 41 años de edad y uno de 90 años de edad.
20 Estos ojos de nuevo se fijaron y procesaron tal como se ha descrito anteriormente, pero esta vez, los cortes se sometieron a tinción con 6F6 como anticuerpo primario y se visualizaron usando un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con FITC, tal como se describe anteriormente. Aunque la muestra del ojo de 90 años de edad había perdido la mayor parte de la
25 retina durante el procesamiento, fue posible detectar reactividad cruzada de

amiloide por 6F6, en los segmentos exteriores del tejido que quedaba. Esta tinción no estaba presente ni en los segmentos externos ni en la retina del ojo del hombre de 41 años de edad. A los donantes humanos de tejido ocular no se les había diagnosticado formalmente AMD pero la presencia de grandes
5 depósitos laminares basales y también su asociación con amiloide beta sugiere con fuerza la etiología de la AMD seca temprana en el tejido ocular teñido con tioflavina T del hombre de 65 años de edad. Aunque en la muestra del ojo de 90 años de edad el procesamiento del tejido había perdido la mayor parte de la retina, el hecho de que la reactividad cruzada de amiloide por 6F6
10 pudiera detectarse en el resto del tejido pero no en ninguno de los segmentos exteriores ni en la retina del ojo de un hombre de 41 años de edad, (que se supone que es demasiado joven para presentar los síntomas de la AMD), es buen presagio del uso de los anticuerpos de tipo 6F6 para la unión al amiloide que se encuentra en los ojos humanos viejos.

15

Clonación de regiones variables de hibridomas

Secuencias de las regiones variables

Se extrajo el ARN total de todas las líneas celulares de los hibridoma y después se generaron secuencias de ADNc de los dominios variables pesados
20 y ligeros mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El cebador directo para la RT-PCR era una mezcla de cebadores degenerados específicos para las secuencias líder de los genes de las inmunoglobulinas y el cebador inverso era específico para la regiones constantes del anticuerpo, de forma que por ejemplo para 6F6 el isotipo IgG2a
25 murino para la cadena pesada y kappa murino para la cadena ligera. Los

cebadores se diseñaron de acuerdo con la estrategia que describen Jones y Bendig (Bio/Technology 9:88, 1991). La RT-PCR se realizó por duplicado para ambas secuencias de la región V para permitir la posterior verificación de las secuencias de la región V correctas. Se clonaron los productos de la región V generados por RT-PCR (Invitrogen TA Cloning Kit) y se obtuvieron los datos de las secuencias.

Secuencia de aminoácidos de V_H de 6F6 (SEC ID N.º: 19)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIVYYVHWLTKQLTEQGLEWIGRID
10 PENGETIYTPKFQDKATLTVDTSNTAYLQLSSLTSEDAAVYYCVSSGYWGQ
GTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 6F6 (SEC ID N.º: 20)

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCT
15 CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATG
TGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG
GATTGATCCTGAAAATGGTGAACTATATATACCCCGAAATTCCAGGACAA
GGCCACTTTGACAGTAGACACATCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACGCTGCCGTGTACTATTGTGTTAGTTCGGGC
20 TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 6F6 (SEC ID N.º: 21)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQPPQLLIY
QMSNLAGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
25 TKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 6F6 (SEC ID N.º: 22)

GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGG
5 CATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCTCAACT
CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
CTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAATCTAGAACTTTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

10

Secuencia de aminoácidos de V_H de 2C1 (SEC ID N.º: 31)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKVYYVHWLKQLTEQGLEWIGRID
PENGETIYAPKFQDKATLTVDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCVSSGYWGQ
GTTTLTVSS

15

Secuencia de ADN de V_H de 2C1 (SEC ID N.º: 32)

GAGGTTTCAGCTACAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATG
TGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG
20 GATTGATCCTGAAAATGGTGAAACTATATATGCCCCGAAATTCCAGGACAA
GGCCACTTTGACAGTAGACACATCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTCGGGC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

25 Secuencia de aminoácidos de V_L de 2C1 (SEC ID N.º: 33)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLAGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

5 Secuencia de ADN de V_L de 2C1 (SEC ID N.º: 34)

GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGGAATGG
CATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCT
CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
10 CTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 2E11 (SEC ID N.º: 35)

15 EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCTASGFNIKVYYIHWLKQLTEQGLEWIGRIDP
ENGETKYVPKFQGKATLTVDTSSNTAYLHLSSLTSED GVYYCVTSGYWGQ
GTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 2E11 (SEC ID N.º: 36)

20 GAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGGTTGTGAAGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGTCTACTATA
TCCACTGGTTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTAGAATGGATTGGAAGG
ATTGATCCTGAAAATGGTGAACTAAGTATGTCCCGAAATTCCAGGGCAAG
GCCACTTTAACAGTAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCACCTCAG
25 CAGCCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGTGTTACCTCGGGCT

ACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 2E11 (SEC ID N.º: 37)

DIVMTQAAFSNPVALGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
5 QMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 2E11 (SEC ID N.º: 38)

GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCGCTCTTGGAAC
10 ATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGG
CATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCT
CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
GTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACG
15 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 4D4 (SEC ID N.º: 39)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIKVYYYVHWLKQLTEQGLEWIGRID
PENGETLYTPKFQGKATLTVDTSSNTAYLQLNSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQ
20 GTSLVSS

Secuencia de ADN de V_H de 4D4 (SEC ID N.º: 40)

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATG
25 TTCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG

GATTGATCCTGAGAATGGTGAACTCTATACACCCCGAAATTCCAGGGCA
AGGCCACTTTGACAGTAGACACATCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTC
AACAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTCGGG
CTACTGGGGCCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTCCTCA

5

Secuencia de aminoácidos de V_L de 4D4 (SEC ID N.º: 41)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLAGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

10

Secuencia de ADN de V_L de 4D4 (SEC ID N.º: 42)

GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGG
CATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCT
15 CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
CTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

20

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5C9 (SEC ID N.º: 43)

EVQLQQSGAEFVRPGASVKLSCTASGFNIKTY^YIHWLKQRTDQGLEWIGRIDP
EDGETKFGPKFRGKATLTADTSSNTASLQLSSLTSED^TGVYYCVTSGYWGQ
GTTLSVSS

25

Secuencia de ADN de V_H de 5C9 (SEC ID N.º: 44)

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGTTTGTGAGGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTATCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAACCTACTATA
TAACTGGCTGAAACAGAGGACTGACCAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAG
GATTGATCCCGAGGATGGTGAACTAAATTTGGCCCGAAATTCCGGGGCA
5 AGGCCACTTTAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTCCCTACAACCTC
AGCAGTCTGACATCTGAGGACACTGGCGTCTATTACTGTGTTACCTCGGG
CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCTCAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 5C9 (SEC ID N.º: 45)

10 DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLAGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 5C9 (SEC ID N.º: 46)

15 GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGC
ATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTC
TTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGT
AGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGG
20 CTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACGT
TCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 5D1 (SEC ID N.º: 47)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIKVYYVHWLQQLTEQGLEWIGRID
25 PENGETKYAPKFQDKATLTVDTSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCVSSGYWGQ

GTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 5D1 (SEC ID N.º: 48)

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCT
5 CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATG
TGCACTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG
GATTGATCCTGAAAATGGTGAACTAAATATGCCCCGAAATTCCAGGACAA
GGCCACTTTGACAGTAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTTCACCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTCGGGC
10 TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 5D1 (SEC ID N.º: 49)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLASGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
15 TKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 5D1 (SEC ID N.º: 50)

GACATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGGAATGG
20 CATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCT
CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
CTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTATTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

25

Secuencia de aminoácidos de V_H de 14B3 (SEC ID N.º: 51)

EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTGSGFNIVYYVHWLQKLTQGLEWIGRID
PENGETLYTPKFQGKATFTVDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCVSSGYWGQ
GTTLTVSS

5

14B3 Secuencia de ADN de V_H de (SEC ID N.º: 52)

GAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGGAGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTAAGGTCTACTATG
TTCAGTGGCTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG
10 GATTGATCCTGAGAATGGTGAACTCTATATACCCCGAAATTCAGGGCAA
GGCCACTTTTACAGTAGACACATCATCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGTTAGTTCGGGC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

15 Secuencia de aminoácidos de V_L de 14B3 (SEC ID N.º: 53)

DIVMTQSAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLAGVPDRFTSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

20 Secuencia de ADN de V_L de 14B3 (SEC ID N.º: 54)

GATATTGTGATGACGCAGTCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATGG
CATCACCTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCT
CCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA
25 CTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACTCTGAAAATCAGCAGAGTGGAG

GCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de V_H de 16D4 (SEC ID N.º: 55)

5 EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHWLKQLTEQGLEWIGRID
PENGETQYAPKFQGKASLTADTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCVSSGYWG
QGTTLTVSS

Secuencia de ADN de V_H de 16D4 (SEC ID N.º: 56)

10 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCT
CAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATA
TGCACTGGTTGAAGCAGTTGACTGAGCAGGGCCTGGAATGGATTGGAAG
GATTGATCCTGAAAATGGTGAAACTCAATATGCCCCGAAATTCAGGGCA
AGGCCTCTTTAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTTCACCTCA
15 GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGTTAGTTCGGGC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de 16D4 (SEC ID N.º: 57)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
20 QMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGGG
TKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 16D4 (SEC ID N.º: 58)

GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACA
25 TCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGC

ATCACTTATTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTC
CTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAG
TAGCAGTGGGTCAGGAAGTATTTTCACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGG
CTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTTGGACGT
5 TCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas en las secuencias de aminoácidos.

10 **Clonación y expresión de la quimera 6F6**

Se generó un anticuerpo quimérico 6F6 (6F6c) constituido por las regiones V murinas progenitoras injertadas en una IgG1 humana para la cadena pesada o regiones C kappa humanas para la cadena ligera para expresar el material de anticuerpo recombinante que podría usarse para confirmar la correcta
15 clonación de las regiones V murinas funcionales. El ADN que codifica las regiones V de la cadena pesada y ligera de 6F6 murino y una secuencia de señal murina (Kabat y cols "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL) se clonaron en marco en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe (para la cadena pesada) y RLN-bshe (para
20 la cadena ligera) que contiene regiones constantes humanas (Fc de IgG1 inactivado o C kappa humana, respectivamente). Mediante la introducción de un sitio de clonación adecuado, la secuencia de aminoácidos de FR4 (región estructural 4 (secuencia de la región V después de CDR3 y antes del primer dominio constante)) de la secuencia de aminoácidos de V_H se cambió de
25 TTLTVSS como se muestra en la SEC ID N.º 19 a TLVTVSS.

Elementos del vector de expresión RLD-bshe para expresión de la cadena pesada:

Pares de bases	Descripción del segmento de ADN
0 - 1014	Promotor (SV40/RSV)
1015 - 2442	Cadena pesada de anticuerpo
2443 - 2765	Poli A
2766 - 3142	Promotor de BG
3239 - 3802	DHFR
3803 - 4162	Poli A
4163 - 6322	Estructura total
5077 - 5937 (hebra complementaria)	Beta lactamasa

5 *(la posición de los elementos y el tamaño global del vector que se proporciona anteriormente son únicamente con fines ilustrativos y dependen del tamaño del inserto de las cadenas de anticuerpos)*

10 Elementos del vector de expresión RLN-bshe para expresión de la cadena ligera:

Pares de bases	Descripción del segmento de ADN
0 - 1014	Promotor (SV40/RSV)
1015 - 1731	Cadena ligera de anticuerpo
1732 - 2051	Poli A
2388 - 2764	Promotor de BG
2774 - 3568	Neomicina
3569 - 3876	Poli A
3877 - 6063	Estructura total
5077 - 5937 (hebra complementaria)	Beta lactamasa

(la posición de los elementos y el tamaño global del vector que se proporciona anteriormente son únicamente con fines ilustrativos y dependen del tamaño del inserto de las cadenas de anticuerpos)

Se identificaron los clones con las secuencias de V_H y V_L correctamente clonadas y se prepararon los plásmidos para la expresión en células CHO. El anticuerpo 6F6c expresado se purificó del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía con proteína A en un sistema de FPLC, y después se analizó para determinar su unión a A β mediante ELISA y SPR usando tecnología BiacoreTM. Los resultados indicaban que se habían clonado y expresado las regiones V de ratón de 6F6 correctas produciendo un anticuerpo funcional con características similares al anticuerpo murino progenitor 6F6.

Estrategia de humanización de la cadena pesada

- Para la secuencia de la cadena pesada variable de ratón de 6F6 se seleccionó una estructura receptora de línea germinal humana (IGHV1-24, SEC. ID. N.º: 13) que tenía un 58% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia variable de la cadena pesada de 6F6 de ratón (SEC ID N.º: 19) junto con el minigen JH4 (Kabat: YFDYWGQGTLVTVSS (SEC ID N.º: 15)). Los primeros cuatro restos de los restos del minigen JH4 entran en la región CDR3 que se sustituye por la CDR entrante del anticuerpo donante.
- 10 Se generó un conjunto de 34 variantes de cadena pesada variable humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y en el posible impacto sobre la función del anticuerpo. Las CDR de la cadena pesada de 6F6 murino (usando la definición de Kabat) (SEC. ID. N.º: 1, 2 y 3) se injertaron en la estructura receptora humana seleccionada anteriormente. Se diseñó un
- 15 número de variantes de cadena pesada variable que comprendían las sustituciones a dos a quince posiciones elegidas de entre las posiciones 1, 5, 13, 24, 27, 28, 29, 30, 37, 40, 41, 48, 66, 67, 69, 71, 75, 76, 93 y 94 (numeración según Kabat) (Tabla 7). Las posiciones 93 y 94 inmediatamente adyacentes a la definición de Kabat de la CDRH3 se incluyeron en todas las
- 20 variantes estudiadas.

Tabla 7 Lista de contramutaciones de V_H investigadas

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
1	Q	E
5	V	Q
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
41	P	T
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
75	T	S
76	D	N
93	A	V
94	T	S

Estrategia de humanización de la cadena ligera

Para la secuencia de la cadena ligera variable de ratón de 6F6 se seleccionó una estructura receptora de línea germinal humana (IGKV2-28) que tenía un 79% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia variable de la cadena pesada de 6F6 de ratón (SEC ID N.º: 21) junto con la región J kappa 1 (Kabat: WTFGQGGTKVEIK) basándose en la similitud de las secuencia. Los primeros

dos restos de los restos del minigen JK-1 entran en la región de CDR3 y son idénticos a los dos últimos restos de la CDR3 de la cadena ligera de 6F6 de ratón.

- 5 Las CDR de la cadena ligera de 6F6 murino (usando la definición de Kabat) (SEC. ID. N.º: 4, 5 y 6) se injertaron en la estructura receptora humana seleccionada anteriormente proporcionando una cadena ligera injertada recta variable L0. Además se generó un conjunto de 13 variantes de cadena ligera variable humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y en el
- 10 posible impacto sobre la función del anticuerpo. Se diseñaron las variantes de la cadena ligera variable humanizada se variantes que comprendían sustituciones en de una a cuatro posiciones que se elegían de entre las posiciones; 8, 11, 43, 63, 64, 100 y 104 (numeración según Kabat) (Tabla 8).

15 **Tabla 8 Lista de contramutaciones de VL investigadas**

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
8	P	A
11	L	N
43	S	P
63	S	T
64	G	S
100	Q (JK-1)	G
104	V (JK-1)	L

Construcción de ADN de cadena pesada y ligera humanizado

Se sintetizaron regiones V humanizadas *de novo* mediante construcción con

oligos superpuestos y por amplificación mediante PCR o por mutagénesis dirigida al sitio usando variantes existentes como plantilla. Se incluyeron los sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y una secuencia de señal murina (Kabat y cols "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL). Los productos de la PCR que codificaban las regiones V humanizadas junto con las secuencias de señal y los sitios de restricción se clonaron después en marco en los vectores de expresión de mamífero: se clonaron variantes de cadena pesada en RLD-bshe para generar ADN que codificaba cadenas pesadas mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa; se clonaron variantes de cadena ligera en marco en el ADN que contenía RLN-bshe que codificaba la región constante kappa humana generando ADN que codificaba cadenas ligeras kappa humanas de longitud completa.

15

Ejemplos representativos de expresión de combinaciones de anticuerpos de cadenas pesadas y ligeras humanizadas

Se transfectaron células CHOK1 de forma transitoria a pequeña escala inicialmente para evaluar las combinaciones de construcciones de ADN de cadenas pesadas y ligeras humanizadas y en placas de 6 pocillos. Las células CHOK1 se pasaron en DMEM F12, con 5% de suero bovino fetal con IgG ultra reducida y glutamina 2 mM a confluencia en placas de 6 pocillos. Las células confluentes se transfectaron con un total de 7,5 µg de ADN: 30 µg de lípido de transfección (para un lípido adecuado véase el documento WO2006/053783) en medio Optimem Glutamax (Invitrogen). Las células transfectadas se

20

25

incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. A las 72 horas se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la concentración de 6 pocillos y después se analizaron para determinar su unión a A β humano mediante ELISA.

5

Los anticuerpos humanizados también se expresaron a gran escala mediante cotransfección de plásmidos de RLD y RLN que codificaban las cadenas pesadas y ligeras en células CHO mediante electroporación. Se seleccionó una población policlonal estable de células que expresaban el anticuerpo apropiado usando un medio sin nucleósidos. El anticuerpo se recuperó y se purificó a partir del sobrenadante mediante FPLC con columnas de ProSepA HiTrap.

10

Evaluación de variantes de V_H humanizadas en un ELISA de unión de β -amiloide

15

Se evaluaron 34 variantes de V_H humanizadas expresadas a pequeña escala en cultivos de 6 pocillos para determinar su unión al péptido A β (1-40) humano. Las 34 cadenas pesadas se analizaron combinadas con la cadena ligera L2 (véase la Tabla 8 a continuación). Algunas combinaciones con L2 sí expresaron el material de anticuerpo pero no se unieron a β -amiloide 1-40 y por lo tanto no pudieron generarse valores de CE50 para estas combinaciones. Cuando fue posible generar valores de CE50, estos diferían entre los experimentos pero variaban desde un aumento de aproximadamente 30 veces en los valores de CE50 a valores idénticos cuando se comparaban con el valor de CE50 de la construcción quimérica usando las regiones V de 6F6 murino

20

25

contenidas en cada experimento como referencia. Los restos 93 y 94 inmediatamente adyacentes a la definición de Kabat de CDRH3 se mantuvieron en todas las variantes humanizadas. Las posiciones 27-30 que pueden considerarse, en términos estructurales, parte de CDRH1 (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196(4): 901-917) proporcionaron una mejor unión cuando se contramutaron que las sustituciones en 93 y 94 solas. Era necesaria una contramutación en los dos restos 24 y 37 juntos para proporcionar una unión potente, sin cualquiera de estos dos restos, las variantes humanizadas no se unían de forma eficaz al péptido A β (1-40) en este formato de ELISA y cuando se combinaban con la cadena ligera L2. La Tabla 9 muestra las mejores variantes de V_H humanizadas en términos de propiedades de unión a amiloide basándose en la combinación con la cadena ligera L2.

Tabla 9 Variantes de VH humanizadas seleccionadas

Variante de VH humanizada	Numeración según Kabat	1	5	13	24	27	28	29	30	37	40	41	48	66	67	69	71	75	76	93	94
humanizada	6F6	E	Q	E	G	F	N	I	K	L	L	T	I	K	A	L	V	S	N	V	S
	IGHV1-24	Q	V	K	V	Y	T	L	T	V	A	P	M	R	V	M	E	T	D	A	T
H11		-	-	E	G	F	N	I	K	L	L	-	I	K	A	L	V	-	-	V	S
H21		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	-	-	-	-	-	-	-	V	S
H23		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	I	-	-	-	-	-	-	V	S
H24		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	-	-	-	-	-	S	N	V	S
H25		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	I	-	-	L	-	-	-	V	S
H26		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	I	-	-	L	-	S	-	V	S
H27		-	-	E	G	F	N	I	K	L	L	-	-	K	A	-	V	-	-	V	S
H28		-	-	E	G	F	N	I	K	L	L	-	-	K	A	L	V	-	-	V	S
H29		-	-	-	G	F	N	I	K	L	L	-	-	K	A	L	V	-	-	V	S

"-" quiere decir que el resto no sufrió cambios a partir de la secuencia de la estructura receptora IGHV1-24

Evaluación de variantes de VL humanizadas en un ELISA de unión de β -amiloide

Se evaluaron variantes de L0 y V_H humanizadas expresadas a pequeña escala en cultivos de 6 pocillos para determinar su unión al péptido A β (1-40) humano. Todas las variantes se analizaron combinadas con H11. La Tabla 10 resume todas las variantes de V_L funcionales generadas.

Tabla 10 Variantes de V_L humanizadas seleccionadas

Variante de VL humanizada	Numeración según Kabat	8	11	43	63	64	100	104
	6F6	A	N	P	T	S	G	L
	IGKV-2-28	P	L	S	S	G	Q	V
L0		-	-	-	-	-	-	-
L2		-	-	-	-	S	-	-
L3		-	-	P	-	-	-	-
L4		-	-	-	T	-	-	-
L5		-	-	-	-	-	G	L
L6		-	-	P	T	-	G	L
L7		-	-	P	-	S	-	-
L8		-	-	P	T	-	-	-
L9		-	N	-	-	S	-	-
L10		A	-	-	-	S	-	-
L11		-	-	-	-	S	G	-
L12		-	N	P	-	-	-	-

L13		A	-	P	-	-	-	-
L14		-	-	P	-	-	G	-

Las mejores combinaciones de V_H de las variantes de cadenas pesadas H11 con las cadenas ligeras L2 y L9, L10, L12 y L13 se examinaron con más
5 cuidado. Para estos experimentos se usó material de anticuerpo purificado generado en células CHO en suspensión. Los resultados de dos experimentos independientes con dos concentraciones de recubrimiento diferentes del péptido A β (1-40) se muestran más adelante en la Tabla 11.

10 **Tabla 11 Valores de CE50 para la unión de las variantes humanizadas al péptido A β (1-40)**

	0,1 μ g/ml A β 1-40 Exp 1	0,5 μ g/ml A β 1-40 Exp 1	0,1 μ g/ml A β 1-40 Exp 2	0,1 μ g/ml A β 1-40 Exp 3
6F6c	0,085 (pred) $\pm$ 0,009	0,06 $\pm$ 0,003	0,043 $\pm$ 0,002	0,048 $\pm$ 0,003
H11L2	0,205 $\pm$ 0,008	0,119 $\pm$ 0,005	0,102 $\pm$ 0,004	0,068 $\pm$ 0,004
H11L9	0,09 $\pm$ 0,009	0,061 $\pm$ 0,002	0,051 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,002
H11L10	0,148 $\pm$ 0,004	0,071 $\pm$ 0,002	0,054 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,001
H11L12	0,189 $\pm$ 0,011	0,06 $\pm$ 0,003	0,055 $\pm$ 0,003	0,058 $\pm$ 0,002
H11L13	0,224 $\pm$ 0,008	0,064 $\pm$ 0,002	0,056 $\pm$ 0,002	0,061 $\pm$ 0,002

Las concentraciones se refiere al péptido A β que se usó para recubrir las placas de microtitulación; los valores que se muestran son de pocillos duplicados y se muestra el ET para cada par.

ELISA competitivo para determinar la unión a β -amiloide 1-40 humano en solución

Se evaluaron 6F6c y los anticuerpos humanizados H11L2, H11L9, H11L10, H11L12 y H11L13 para determinar su capacidad de unirse al péptido A β 1-40 en solución e inhibir la interacción del péptido A β 1-40 humano con anticuerpo monoclonal de ratón 6F6 en un ELISA competitivo. Se preincubó una concentración constante de β -amiloide 1-40 biotinilado con cantidades diluidas en serie de variantes humanizadas del anticuerpo 6F6. Después se añadió la mezcla que incluye amiloide en complejos y libre a los pocillos que contenían anticuerpo monoclonal de ratón 6F6 inmovilizado y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y después se detectó la cantidad de β -amiloide libre que todavía estaba disponible para unirse al anticuerpo monoclonal 6F6 progenitor inmovilizado usando conjugado de estreptavidina-HRP.

15

La Tabla 12 muestra los valores de CI50 de esta competición para dos experimentos independientes usando material de anticuerpo purificado. Todas las variantes humanizadas fueron capaces de competir eficazmente para unirse al anticuerpo monoclonal 6F6 progenitor con valores de CI50 muy similares.

20

Tabla 12: Valores de CI50 para la competición de variantes humanizadas en su unión a β -amiloide 1-40 humano con anticuerpo monoclonal 6F6 mediante ELISA

Variante humanizada	Exp 1		Exp 2	
	CI50 $\mu\text{g/ml}$	Error típico	CI50 $\mu\text{g/ml}$	Error típico
6F6c	0,566	0,027	0,451	$\pm 0,013$
H11L2	0,862	0,024	0,578	$\pm 0,024$
H11L9	0,588	0,018	0,518	$\pm 0,028$
H11L10	0,622	0,041	0,519	$\pm 0,016$
H11L12	0,561	0,025	0,549	$\pm 0,018$
H11L13	0,616	0,015	0,531	$\pm 0,023$

5

Cinética de la unión de variantes humanizadas determinada mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial

Se determinó la afinidad de las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras usando un aparato Biacore T100. Se realizaron tres experimentos independientes usando anticuerpo humanizado inmovilizado mediante chips Biacore con superficie de proteína A e inyección de péptidos β -amiloide 1-40. La molécula quimérica de 6F6 sirvió de molécula de referencia. Para esto se inmovilizó Proteína A sobre un chip CM5 mediante acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se capturaron anticuerpos contra β -amiloide sobre esta superficie y después de un periodo de estabilización se hizo pasar β -amiloide 1-40 humano a concentraciones de 256-2 nM en diluciones a la mitad. Se usó una inyección de tampón sobre la

10

15

superficie del anticuerpo capturado como doble referencia del conjunto de datos de acuerdo con la mejor práctica Biacore. Las condiciones de regeneración ligeramente ácidas elegidas eliminaron el anticuerpo pero no afectaron significativamente la capacidad de la superficie de Proteína A de realizar otro evento de captura. El trabajo se realizó en HBS-EP a 25 °C. Los resultados se resumen en la Tabla 13 en términos de la media de los tres experimentos.

10 **Tabla 13 Datos de afinidad y cinética para variantes de anticuerpo humanizado purificadas seleccionadas**

Construcción de anticuerpo	KD media [nM]	ET
6F6c	3,74	1,20
H11L2	9,57	2,31
H11L9	4,91	1,25
H11L10	5,57	1,66
H11L12	6,95	2,34
H11L13	7,41	2,39

Los datos muestran la KD media y el ET de tres experimentos independientes

Mapeo detallado de los epítomos del anticuerpo humanizado H11L9

15 Se realizó un mapeo detallado del epítipo de unión mínimo del anticuerpo humanizado monoclonal H11L9 usando el lector de placas SRU BIND (SRU Biosystems). Se generaron tres conjuntos de péptidos, basándose en una secuencia de 18 aminoácidos para el mapeo detallado del epítipo: a) un

conjunto de péptidos barridos con alanina para el que 10 de los restos 27-37 se sustituyeron consecutivamente con un resto alanina; b) un conjunto de péptidos truncados en el extremo N en el que se eliminaba sucesivamente un resto del extremo N del péptido 18-mero empezando a partir del resto 23 y c) un conjunto de péptidos truncados en el extremo C en el que se eliminaba sucesivamente un resto del extremo C del péptido 18-mero empezando a partir del resto 40.

Todos los péptidos se generaron en el siguiente formato; Biotina-enlazador de SGSG- PÉPTIDO-amida, el enlazador se alargaba cuando era necesario para asegurar que todos los péptidos eran 22-meros.

Se lavó una placa biosensora recubierta con estreptavidina (SRU Biosystems) con PBS y se centrifugó boca abajo para eliminar el tampón y después se lavó con PBS, 0,1% de tween20 y 0,4% de acetonitrilo y se centrifugó boca abajo para eliminar el tampón residual. Los pocillos se volvieron a suspender en 100 µl de PBS, 0,1% de tween20 y 0,4% de acetonitrilo y se leyeron en el lector de placas SRU para establecer los valores iniciales. Después se eliminaron 50 µl del tampón y se añadieron 50 µl de péptido diluido y se dejó que se unieran. La placa después se lavó con PBS dos veces y después se volvió a suspender en 100 µl de PBS y se volvieron a medir los valores iniciales. Una vez se hubieron establecido los valores iniciales, se eliminaron 50 µl de tampón y se añadió H11L9 y un anticuerpo de control a una concentración final de 30 µg/ml. Se controló la unión de los anticuerpos. Las placas se lavaron dos veces con PBS y se volvieron a suspender en 100 µl de PBS, y las placas se

volvieron a medir y se referenciaron de nuevo a la adición de anticuerpo para buscar moléculas con enlace débil que pudieran eliminarse mediante la etapa de lavado. Se tomaron los niveles de unión de la placa lavada y se analizaron para determinar la unión de los anticuerpos al conjunto de diversos péptidos.

5

La delección en el extremo N de la región no mostró efectos sobre la unión cuando se eliminaron los restos D23 a N27 de forma secuencial. La delección de K28 provocó una reducción de la unión en más del 50% pero la delección de los restos G29 a A30 no redujo más la unión. La delección del resto I31 y más allá suprimió totalmente la unión. Esto definió la frontera del extremo N que
10 requería K28 para la unión completa. La delección en el extremo C de la región no mostró efectos sobre la unión cuando se eliminaron los restos V40 a L34 de uno en uno. Sin embargo, la unión se suprimió completamente al eliminar la posición G33 y más allá. Esto definió la frontera del extremo C que requería al
15 menos el resto G33 para la unión. Por lo tanto, los datos de la delección en los extremos N y C tomados junto mapearon de forma detallada H11L9 al epítipo mínimo KGALLG, restos 28-33, en el péptido β -amiloide. Esto confirma el mapeo de péptidos superpuestos anterior de los epítipos con anticuerpo monoclonal 6F6 pero la eliminación del resto M35 pareció provocar un
20 descenso en la señal de unión con 6F6.

El barrido de sustitución con alanina de los restos N27 a G37 mostró que la sustitución de los aminoácidos I32 y en particular G33 con alanina tenía el mayor impacto sobre la unión. Estos datos también confirmaron los datos de
25 delección del extremo C anteriores en los que G33 parecía ser crucial para la

unión de este anticuerpo. Los resultados se resumen en la Tabla 14 en forma esquemática.

5 Tabla 14 Resumen esquemático del mapeo detallado de los epítomos para H11L9

N.º de residuo en beta
amiloide

Aminoácido

Barrido con alaninas

Truncado en el extremo N >

Truncado en el extremo C >

23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M	V	G	G	V	V

Resto no investigado en el conjunto de péptidos

Ningún impacto sobre la unión (similar a de un 18-mero completo)

Unión reducida

La eliminación del resto provoca pérdida de la unión

No fue posible evaluar

Desinmunización del anticuerpo humanizado H11L9

10

Se realizó una evaluación *in vitro* de los potenciales epítomos en células Th y se sustituyeron restos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de los dominios de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable (SEC ID N.º: 24 y SEC ID N.º: 26 respectivamente) por restos alternativos para destruir estos epítomos a la vez que se mantenía la funcionalidad. Las posiciones 23, 30, 31, 38, 42, 61 y 95 para Vh y los restos 11, 30, 52 y 53 para VL se sustituyeron con los aminoácidos alternativos que se muestran en las Tablas 15 y 16 para cada posición.

15

Tabla 15 Sustituciones de aminoácidos seleccionadas en H11 de Vh humanizada

Variante humanizada de Vh	Numeración según Kabat	23	30	31	38	42	61	95
	H11	K	K	V	R	G	P	S
H36		T	-	-	-	-	-	-
H37		-	H	-	-	-	-	-
H38		-	-	T	-	-	-	-
H39		-	-	-	Q	-	-	-
H40		-	-	-	-	E	-	-
H41		-	-	-	-	-	Q	-
H42		-	-	-	-	-	-	R
H43		T	H	T	Q	E	Q	R
H44		T	H	T	Q	E	Q	-
H45		-	H	T	-	-	-	-
H46		T	H	-	-	-	-	-
H47		T	-	-	-	E	-	-
H48		-	H	-	-	E	-	-
H49		-	-	T	-	E	-	-
H50		T	H	-	-	E	-	-
H51		-	H	T	-	E	-	-

Tabla 16 Sustituciones de aminoácidos seleccionadas en L9 de VL humanizada

Variante de VL humanizada	Numeración según Kabat	11	30	52	53
	L9	N	I	S	N
L15		-	K	-	-
L16		-	-	D	-
L17		-	-	-	H
L18		L	K	D	H
L19		-	K	D	H
L20		-	-	D	H
L21		-	K	D	-
L22		-	K	-	H

Las regiones V se sintetizaron mediante construcción con oligos superpuestos y amplificación por PCR tal como se describe anteriormente o mediante mutagénesis dirigida al sitio usando las variantes H11 y L9 de cadena pesada y ligera como plantillas. Se incluyeron los sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y una secuencia de señal murina (Kabat y cols "Sequences of Immunological Interest", NIH, 1991, Quinta edición, p3.0 95VNP'CL). Los productos que que codificaban las regiones V modificadas se clonaron después en los vectores de expresión de mamífero: se clonaron variantes de cadena pesada en RLD-bshe con el promotor pEF para generar ADN que codificaba cadenas pesadas

mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa; se clonaron variantes de cadena ligera en marco en el ADN que contenía RLN-bshe con el promotor pEF que codificaba la región constante kappa humana generando ADN que codificaba cadenas ligeras kappa humanas de longitud completa.

5

Inicialmente, se expresaron variantes nuevas de Vh H36-H44 y se evaluaron combinadas con la cadena ligera L9 y se expresaron y evaluaron nuevas variantes de VL L15-L18 combinadas con la cadena pesada H11. Los anticuerpos expresados se analizaron para determinar su unión a beta amiloide 1-40 sintético usando el sobrenadante de cultivo de expresión y análisis por ELISA y Biacore. Después de esta evaluación, se combinaron los cambios únicos que mejor mantenían la potencia de unión generando construcciones de cadenas pesada y ligera H45-H51 y L19-L22. Estas nuevas variantes de las cadenas se expresaron de nuevo combinadas con las cadenas emparejadas H11 y L9 tal como se describe anteriormente. Para este segundo conjunto de variantes, se combinaron las mejores cadenas pesadas (H48-H51) o ligeras (L19-L21) entre sí para generar un tercer conjunto que de nuevo se expresó e investigó mediante Biacore para determinar la cinética de la unión a beta amiloide 1-40. La Tabla 17 muestra esas combinaciones y la cinética de unión

10

15

20

Tabla 17: Conjunto seleccionado de construcciones desimmunizadas humanizadas y cinética de unión (Biacore)

Construcciones	ka	kd	KD (nM)
H48L19	1,474E+5	4,643E-4	3,15
H49L19	1,549E+5	4,780E-4	3,09
H50L19	1,333E+5	3,682E-4	2,76
H51L19	1,405E+5	3,717E-4	2,65
H48L20	1,024E+5	2,065E-4	2,02
H49L20	9,967E+4	2,223E-4	2,23
H50L20	8,486E+4	2,122E-4	2,50
H51L20	9,646E+4	2,149E-4	2,23
H48L21	1,453E+5	2,922E-4	2,01
H49L21	1,405E+5	3,621E-4	2,58
H50L21	1,232E+5	2,671E-4	2,17
H51L21	1,383E+5	2,840E-4	2,05
H11L9 (sup)	1,019E+5	2,517E-4	2,47
H11L9 (pur)	1,013E+5	2,490E-4	2,46
Quimera 6F6 (pur)	1,815E+5	1,809E-4	1,00

Procedimiento Biacore que se usó para determinar la cinética de unión

- 5 El anticuerpo contra IgG humana (Biacore BR-1008-39) se acopló sobre un chip biosensor CM5 mediante acoplamiento de amina primaria. Los anticuerpos contra beta amiloide se capturaron sobre esta superficie. Después

se hizo pasar beta amiloide (1-40) a 256, 64, 16, 4 y 1 nM, usando 0 nM (es decir, se hizo pasar tampón solo sobre la superficie del anticuerpo capturado) como referencia doble. Entre cada inyección de amiloide, la superficie se regeneró usando MgCl_2 3 M, esto eliminó el anticuerpo capturado pero no
5 afectó significativamente a la capacidad de la superficie contra la proteína humana de capturar anticuerpos en análisis posteriores. Los datos se analizaron usando el modelo 1:1 inherente a la T100. El experimento se realizó a 25 °C y 37 °C usando HBS-EP como tampón para el experimento.

10 A partir de este conjunto, se evaluaron también algunas construcciones para determinar la cinética de su unión a temperatura fisiológica. La Tabla 18 muestra la cinética de unión de un subconjunto de estas construcciones a 37 °C.

Tabla 18: Subconjunto seleccionado de construcciones de la Tabla 17
15 **evaluadas para determinar la cinética de unión a 37 °C (Biacore)**

Construcción	ka	kd	KD (nM)
H48L20	3,080E+5	1,091E-3	3,54
H50L20	2,704E+5	9,466E-4	3,50
H51L20	2,670E+5	1,037E-3	3,89
H48L21	3,776E+5	1,017E-3	2,69
H50L21	3,503E+5	9,463E-4	2,70
H51L21	3,384E+5	9,817E-4	2,90
H48L17	2,839E+5	1,340E-3	4,72
H49L17	3,439E+5	1,448E-3	4,21
H11L9 (sup)	2,970E+5	8,592E-4	2,89
H11L9 (pu)	3,261E+5	1,015E-3	3,11

Secuencias de aminoácidos de las regiones V de las estructuras receptoras y variantes humanizadas

Región V de la estructura receptora de la cadena pesada de IGVH1-24, secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 13)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGG
FDPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCAT

ADN de la región V de la estructura receptora de la cadena pesada de IGVH1-24 (SEC ID N.º: 14)

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCC
ATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAG
GTTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGC
15 AGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACA

Secuencia de aminoácidos de la región V de la estructura receptora de la cadena ligera de IGKV2-28 (SEC ID N.º: 16)

20 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI
YLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP

ADN de la región V de la estructura receptora de la cadena ligera de IGKV2-28 (SEC ID N.º: 17)

25 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGA

GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATG
GATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
CTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTT
CAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGG
5 AGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCT

**Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada
humanizada de H11**

(SEC ID N.º: 23)

10 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGGAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGGTTCCGGATTCAACATTAAGGTCTACTAT
GTGCACTGGCTGCGACAGCTTCCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATCGGAA
GGATTGATCCTGAAAATGGTGAACTATATATACCCCGAAATTCCAGGACA
15 AGGCCACCTTGACCGTAGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTG
AGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGTTAGTTCGGG
CTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

**Secuencia de aminoácidos de la región variante V de la cadena pesada
humanizada de H11**

(SEC ID N.º: 24)

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKGSGFNIVVYVHWLRQLPGKGLEWIGRID
PENGETIYTPKFQDKATLTVDSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
25 GTLVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena ligera humanizada de L9

(SEC ID N.º: 25)

5
GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCAATCCCGTCACCCCTGGAGA
GCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCAAGAGTCTCCTACATAGGAATG
GCATCACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
CTCCTGATCTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGGGTCCCTGACAGGTT
10 CAGTAGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGG
AGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCGCTCAAAATCTAGAACTTTGGA
CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de la región variante V de la cadena ligera humanizada de L9

(SEC ID N.º: 26)

DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQG
20 TKVEIK

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de H11 maduro (SEC ID N.º: 27)

25 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKGSGFNIKVYYVHWLRQLPGKGLEWIGRID

PENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDYAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
5 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

**Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de L9 maduro
(SEC ID N.º: 28)**

DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
15 QMSNLAGVGPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

20 **ADN de la cadena pesada de H11 optimizado (SEC ID N.º: 29)**

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCC
AGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGGCAGCGGCTTCAACATCAAAGTGTACTA
CGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCGGAAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
25 CAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCCAG

GACAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGG
AACTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGTGAG
CAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGAGCAGCGCCAG
CACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACC
5 AGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCG
AGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGGGTGCA
CACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC
GTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
10 CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCTGAA
CTGGCCGGAGCCCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACA
CCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGTACAACAGCA
15 CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA
CGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAACCCCAGG
TGACACCCTGCCCCCCTCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
20 TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTG
TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA
CAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCG
GCAAG

25

ADN de la cadena ligera de L9 optimizado (SEC ID N.º: 30)

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCG
AGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAA
5 CGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCC
CAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACC
GGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
GGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAG
CTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGG
10 CCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAG
CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG
GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC
AGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG
CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTAC
15 GCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCT
TCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de H48 (SEC ID N.º: 59)

20 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKGSGFNIHVYYVHWLRQLPEKGLEWIGRID
PENGETIYTPKFQDKATLTVDSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
GTLVTVSS

25 **Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H48**

(SEC ID N.º: 60)

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCC
AGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGGCAGCGGCTTCAACATCCACGTGTACT
5 ACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
CAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCCAG
GACAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGG
AACTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGTGAG
CAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

10

**Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de
H49 (SEC ID N.º: 61)**

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCCKGSGFNIKTYVHWLRQLPEKGLEWIGRID
15 PENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDYMESSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
GTLVTVSS

**Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H49
(SEC ID N.º: 62)**

20

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCC
AGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGGCAGCGGCTTCAACATCAAAACCTACTA
CGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
CAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCCAG
25 GACAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGG

AACTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGTGAG
CAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

**Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de
5 H50 (SEC ID N.º: 63)**

QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCTGSGFNHVVYVHWLRQLPEKGLEWIGRID
PENGETIYTPKFQDKATLTVDSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
GTLVTVSS

10

**Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H50
(SEC ID N.º: 64)**

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGGCC
15 AGCGTGAAGGTGAGCTGCACCGGCAGCGGCTTCAACATCCACGTGTACT
ACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
CAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCCAG
GACAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGG
AACTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGTGAG
20 CAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

**Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena pesada de
H51 (SEC ID N.º: 65)**

25 QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKGSGFNHTYYVHWLRQLPEKGLEWIGRID

PENGETIYTPKFQDKATLTVDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCVSSGYWGQ
GTLVTVSS

Secuencia de ADN de la región variante V de la cadena pesada de H51
5 **(SEC ID N.º: 66)**

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAGAACCCGGCGCC
AGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGGCAGCGGCTTCAACATCCACACCTACT
ACGTGCACTGGCTGAGGCAGCTGCCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGATTGG
10 CAGGATCGACCCCGAGAACGGCGAGACCATCTACACCCCAAGTTCCAG
GACAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGG
AACTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGTGAG
CAGCGGGTATTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

15 **Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de**
L19 (SEC ID N.º: 67)

DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLHRNGKTYLYWYLQKPGQSPQLLI
YQMDHLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQ
20 GTKVEIK

Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L19 (SEC
ID N.º: 68)

25 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCG

AGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAA
CGGCAAGACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCC
CAGCTGCTGATCTACCAGATGGACCACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACC
GGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
5 GGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAG
CTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

**Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de
L20 (SEC ID N.º: 69)**

10 DIVMTQSPLSNPVTGPGEPAISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
QMDHLASGVDPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQG
TKVEIK

15 **Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L20 (SEC
ID N.º: 70)**

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCG
AGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAA
20 CGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCC
CAGCTGCTGATCTACCAGATGGACCACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACC
GGTTCTCTAGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
GGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAG
CTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

25

Secuencia de aminoácidos de la región variante de la cadena ligera de L21 (SEC ID N.º: 71)

DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLHRNGKTYLYWYLQKPGQSPQLLI
5 YQMDNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELWTFGQ
GTKVEIK

Secuencia de ADN de la región variante de la cadena ligera de L21 (SEC ID N.º: 72)

10 GACATCGTGATGACCCAGAGCCCACTGAGCAATCCCGTGACTCCCGGCG
AGCCCGCCTCAATCAGCTGCAGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGCACAGGAA
CGGCAAGACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCC
CAGCTGCTGATCTACCAGATGGACAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGACC
15 GGTTCCTCTAGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAG
GGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAG
CTCTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAA

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -amiloide.
2. Una proteína terapéutica de unión a antígenos de acuerdo con la reivindicación 1 que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que contiene
10 los restos 28-34 ó 28-33 de β -amiloide.
3. Una proteína terapéutica de unión a antígenos que reconoce un epítipo de péptido β -amiloide que está dentro de la región de los restos 28-35 de β -amiloide.
15
4. Una proteína terapéutica de unión a antígenos como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo.
20
5. Un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y/o derivado del mismo que se une a péptido β -amiloide y que comprende las siguientes CDR, o una variante de CDR del mismo:
- 25 CDRH1: VYYVH (SEC ID N.º: 1)

CDRH2: RIDPENGETIYTPKFQD (SEC ID N.º: 2)

CDRH3: SGY (SEC ID N.º: 3)

CDRL1: RSSKSLLHRNGITYLY (SEC ID N.º: 4)

5 CDRL2: QMSNLAS (SEC ID N.º: 5)

CDRL3: AQNLELWT (SEC ID N.º: 6).

6. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24
10 (SEC ID N.º: 13) junto con una estructura 4.

7. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la secuencia de la estructura 4 es la que codifica el minigen JH4 humano (Kabat):
15 YFDYWGGGTLVTVSS (SEC ID N.º: 15)
y en el que la secuencia completa de la CDR3 de la cadena pesada la proporciona la inmunoglobulina donante.

8. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que
20 la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28 (SEC ID N.º: 16) junto con una estructura 4.

9. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la secuencia de la estructura 4 es la que codifica el minigen JK-1 humano
25 (Kabat):

WTFGQGGTKVEIK (SEC ID N.º: 18).

10. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la estructura de la cadena pesada receptora humana se deriva de IGHV1-24 y
5 del minigen JH4 y la estructura de la cadena ligera receptora humana se deriva de IGKV2-28 y del minigen JK-1 que opcionalmente contiene una o más sustituciones de restos aminoacídicos en base a los restos correspondientes que se encuentran en el dominio V_H del donante que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 y el dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 21 que
10 mantiene toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo donante por el péptido β-amiloide.
11. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la estructura de la cadena pesada receptora humana tiene una o más
15 sustituciones de restos aminoacídicos que se seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Resto correspondiente en 6F6 murino
1	Q	E
5	V	Q
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L

40	A	L
41	P	T
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V
75	T	S
76	D	N
93	A	V
94	T	S

12. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la estructura de la cadena pesada receptora humana comprende los siguientes restos (o un sustituto conservador de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
13	K	E
24	V	G
27	Y	F
28	T	N
29	L	I
30	T	K
37	V	L
40	A	L
48	M	I
66	R	K
67	V	A
69	M	L
71	E	V

93	A	V
94	T	S

13. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la estructura de la cadena ligera receptora humana tiene una o más sustituciones de restos aminoacídicos que se
5 seleccionan a partir de los siguientes restos (o sustituciones conservadoras de los mismos):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
8	P	A
11	L	N
43	S	P
63	S	T
64	G	S
100	Q (JK-1)	G
104	V (JK-1)	L

14. Un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la estructura de la cadena ligera receptora humana comprende los siguientes
10 restos (o un sustituto conservador del mismo):

Numeración Kabat del resto	Resto en la estructura humana (IGHV1-24 donante)	Sustitución del resto
11	L	N
64	G	S

15. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 24 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 26.
- 5 16. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 10 17. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 15 18. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 20 19. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 67.
- 20 20. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.
- 25 21. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la

secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.

22. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
5 secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.

23. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la
10 secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 69.

24. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 59 y un dominio V_L que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.
15

25. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 61 y un dominio V_L que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.

20 26. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 63 y un dominio V_L que tiene la
secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.

27. Un anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_H que tiene la
25 secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 65 y un dominio V_L que tiene la

secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 71.

28. Un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene
5 la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28.

29. Una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las
10 reivindicaciones 5 a 28.

30. Un procedimiento de tratamiento a un paciente humano que padece una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide, procedimiento que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad
15 terapéuticamente eficaz de una proteína terapéutica de unión a antígenos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o un anticuerpo terapéutico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 28.

31. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 30, en el
20 que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer, degeneración macular senil (AMD), glaucoma o formación de cataratas dependiente de β -amiloide.

32. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 30 ó 31, en el que la proteína o anticuerpo de unión a antígenos se administra combinada
25 con un inhibidor de la vía de complemento o un inhibidor de un activador de la

vía de complemento.

33. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a
antígenos tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o
5 un anticuerpo tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-
28, y un inhibidor de la vía de complemento o un inhibidor de un activador de
la vía de complemento.

34. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 30, o una
10 composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 33, en el
que el inhibidor de la vía de complemento es un factor de complemento H,
(CFH) o un receptor de complemento 1 soluble, (sCR1).

35. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 30, o una
15 composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 33, en el
que el inhibidor de un activador de la vía de complemento es un inhibidor de
factor de complemento D (CFD).

36. Uso de una proteína terapéutica de unión a antígenos de acuerdo con
20 una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o un anticuerpo terapéutico de
acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 28 en la fabricación de
un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con
péptido β -amiloide.

25 37. Un uso tal como se reivindica en la reivindicación 36, en el que la

enfermedad es enfermedad de Alzheimer, degeneración macular senil (AMD),
glaucoma o formación de cataratas dependiente de β -amiloide.

38. Un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico del mismo que tiene
5 una primera especificidad hacia:

a) un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-35 de β -
amiloide;

b) un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-34 de β -
amiloide;

10 c) un epítipo de péptido β -amiloide que contiene los restos 28-33 de β -
amiloide; o

d) un epítipo en la región de restos 28-35 de β -amiloide;

y una segunda especificidad hacia un activador de la vía de complemento.

15 39. Una proteína de unión a antígenos tal como se define en una cualquiera
de las reivindicaciones 1-4, un anticuerpo tal como se define en una cualquiera
de las reivindicaciones 6-28 o un anticuerpo biespecífico o fragmento
biespecífico del mismo tal como se define en la reivindicación 38, para usar en
el tratamiento de una enfermedad relacionada con péptido β -amiloide.

20

40. Una proteína, anticuerpo o anticuerpo biespecífico o fragmento
biespecífico del mismo de unión a antígenos tal como se reivindica en la
reivindicación 39, en la que la enfermedad relacionada con péptido β -amiloide
es enfermedad de Alzheimer o una enfermedad o trastorno que afecta al ojo o
25 al nervio óptico que se caracteriza por niveles de β -amiloide o depósitos de β -

amiloide elevados.

41. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N.º: 19 y un dominio V_L que tiene la secuencia:
5 SEC ID N.º: 21.

42. Una proteína de unión a antígenos (proteína A de unión a antígenos) que compete con un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 27 y una cadena ligera que tiene
10 la secuencia que se expone en la SEC ID N.º: 28 (anticuerpo B) para su unión a β -amiloide en un ensayo ELISA.

43. Una proteína A de unión a antígenos tal como se reivindica en la reivindicación 42, en la que la proteína A de unión a antígenos y el anticuerpo
15 B están presentes en cantidades equimolares.

44. Una proteína A de unión a antígenos tal como se reivindica en la reivindicación 42 o en la reivindicación 43, en la que la presencia de proteína A de unión a antígenos reduce la unión del anticuerpo B a β -amiloide en un
20 ensayo ELISA en más de 10%, 20%, 30%, 40% o 50%.

45. Una proteína A de unión a antígenos como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 42-44, en la que β -amiloide se une a una placa de inmunoensayo en un ensayo ELISA.

25

46. Una proteína A de unión a antígenos tal como se reivindica en la reivindicación 45, en la que la proteína A de unión a antígenos reduce la unión del anticuerpo B a β -amiloide unido a placas, mientras que un control no específico contra β -amiloide no se une.

5

47. Un anticuerpo que comprende cadenas pesada y ligera que comprenden polipéptidos que son al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N.º: 27, y SEC ID N.º: 28, respectivamente, en el que dicho anticuerpo se une a β -amiloide.

10

48. Una proteína de unión a antígenos que se une a un péptido β -amiloide biotinilado en el extremo C que comprende los restos 24-35 (SEC ID N.º: 10) o 28-39 (SEC ID N.º: 11) de β -amiloide según se determina mediante resonancia de plasmón superficial, estando dicho péptido unido a un chip sensor con estreptavidina.

15

49. Una proteína de unión a antígenos que se une específicamente a β -amiloide y requiere al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide para su unión.

20

50. Una proteína de unión a antígenos tal como se reivindica en la reivindicación 49, en la que la proteína de unión a antígenos además requiere para su unión al menos un resto que flanquea o un resto estructuralmente próximo a dicho al menos un resto en la región 28-35 de β -amiloide.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ELLIS Jonathan Henry
FORD Susannah Karen
GERMASCHEWSKI Volker
SODEN Peter Ernest
WATTAM Trevor Anthony Kenneth
ALARD Philippe Marc Louis
LEWIS Alan
THOMAS Pamela Joan

<120> Anticuerpos

<130> PB62764

<150> GB 0724185.4
<151> 2007-12-11

<150> GB 0806230.9
<151> 2008-04-04

<150> US 61/043839
<151> 2008-04-10

<160> 73

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRH1

<400> 1
Val Tyr Tyr Val His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRH2

<400> 2
Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Asp

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRH3

<400> 3
Ser Gly Tyr
1

<210> 4

<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRL1

<400> 4
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRL2

<400> 5
Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de CDRL3

<400> 6
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> conjugado peptidico que contiene restos de beta amiloide
27-38 que se usan para inmunización y tamizado

<400> 7
Cys Gly Gly Gly Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly
1 5 10 15

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Peptido de ensayo que contiene restos de beta amiloide
24-34

<400> 8
Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido para el mapeo de epítomos que contiene beta amiloide
restos 28-35

<400> 9

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido para el mapeo de epítomos que contiene beta amiloide
restos 24-35

<400> 10

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

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido para el mapeo de epítomos que contiene beta amiloide
restos 28-39

<400> 11

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido para el mapeo de epítomos que contiene beta amiloide
restos 31-42

<400> 12

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr

<210> 14
<211> 294
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 14
caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60
tcctgcaagg ttcccgata caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgatcctg aagatgggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaca 294

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 16
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro
100

<210> 17
<211> 300
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggccc 180
tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggcagagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

<210> 20

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 20

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag gttctggctt caacattaag gtctactatg tgcactggct gaagcagttg 120
actgagcagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg aaaatgggtga aactatatac 180
accccgaaat tccaggacaa ggccactttg acagtagaca catcatccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac gctgccgtgt actattgtgt tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 22
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus muscularis

<400> 22
 gatattgtga tgacgcagtc tgcattctcc aatccagtc ctcttggaac atcagcttcc 60
 atctcttgca ggtctagcaa gagtctccta cataggaatg gcatcaccta tttgtattgg 120
 tatctgcaga agccaggcca gccctctcaa ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
 tcaggagtcc cagacaggtt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac tctgaaaatc 240
 agcagagtgg aggcctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaa 333

<210> 23
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN de VH de H11

<400> 23
 caggtccagc tgggtacagc tggggctgag gtgaaggagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg gttccggatt caacattaag gtctactatg tgcactggct gcgacagctt 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatcgggaagg attgatcctg aaaatgggtg aactatata 180
 accccgaaat tccaggacaa ggccaccttg accgtagaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgt tagttcgggc 300
 tactggggcc agggcacact agtgaccgtg tccagc 336

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aa de VH de H11

<400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
 20 25 30
 Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 25
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN de VL de L9

<400> 25
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc aatcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcttgca ggtctagcaa gagtctccta cataggaatg gcatcaccta tttgtattgg 120

```
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct atcagatgac caaccttgcc 180
tcagggggtcc ctgacaggtt cagtagcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tgggtgggtt tattactgag ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcggcc aagggaacca ggtggaaatc aaa 333
```

<210> 26
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de VL de L9

```
<400> 26
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
```

<210> 27
<211> 442
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena pesada de H11

```
<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 28
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aa de cadena pesada de L9

<400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 29
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN de cadena pesada de H11 (optimizado)

<400> 29

```
cagggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgag gtgaaagaac cggcgccgag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg gcagcggctt caacatcaaa gtgtactacg tgcactggct gaggcagctg 120
ccccgaaaag gccctggagt gattggcagg atcgaccccg agaaccggcg gaccatctac 180
acccccaaagt tccaggacaa gggcaccctg accgtggaca ccagcaccga caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gtccgaggat accgccgtct actactgctg gagcagcggg 300
tattggggcc agggcacact agtgaccgtg agcagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg 360
ttccccctgg cccccagcag caagagcacc agcggcggca cagccgccct gggctgcctg 420
gtgaaggact acttccccga gcccgtagac gtgtcctgga acagcggagc cctgacaagc 480
gggggtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg 540
gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600
cccagcaaca ccaagggtga caagaagggt gagcccaaga gctgcgacaa gaccacacc 660
tgccccccct gccctgcccc tgaactggcc ggagccccct cctgttccct gttccccccc 720
aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac 780
gtgagccacg aggaccctga ggtgaagtgc aattgtacg tggacggcgt ggaagggtcac 840
aacgccaaga ccaagccccg ggaggaaacg tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg 900
ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaagaat acaagtgcga ggtgtccaac 960
aaggccctgc ctgcccccat cgagaaaacc atcagcaagg ccaaggggca gccaggggaa 1020
ccccaggtgt acaccctgac cccctcccg gacgagctga ccaagaacca ggtgtccctg 1080
acctgtcttg tgaagggtct ctaccaccag gacatcgccg tggagtggga gagcaaccgc 1140
cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc 1200
ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc cgggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc 1260
agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccagga agagcctgag cctgtccccc 1320
ggcaag
```

<210> 30

<211> 654

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ADN de cadena ligera de L9 (optimizado)

<400> 30

```
gacatcgtga tgaccagag cccactgagc aatccccgtga ctcccgccga gcccgcccca 60
atcagctgca ggagcagcaa gagcctgctg cacaggaacg gcataccta cctgtactgg 120
tatctgcaga agcccgccga gagccccag ctgctgatct accagatgac caacctggcc 180
agcggcgctg ccgaccggtt ctctagcagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agcaggggtg aagccgagga cgtggcgctg tactactgct ccagaaacct ggaactctgg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 360
atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
aacaacttct accccggga ggccaagggt cagtggaaag tggacaatgc cctgcagagc 480
ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
agcaccctga ccttgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgagggtg 600
accaccagg gccgtgccag ccccgtagac aagagcttca accggggcga gtgc 654
```

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus muscularis

<400> 31

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

<210> 32

<211> 336
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 32
gaggttcagc tacagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag gttctggctt caacattaag gtctactatg tgcactggct gaagcagttg 120
actgagcagg gcctggaatg gattggaagg attgacctg aaaaatggta aactatatat 180
gccccgaaat tccaggacaa ggccactttg acagtagaca catcatccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attattgtgt tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 33
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 34
gatattgtga tgacgcagtc tgcattctcc aatccagtc ctcttggaaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gactctccta cataggaatg gcatcaccta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac tctgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 35
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Leu Lys Gln Leu Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
val Thr Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 36
<211> 336

<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 36
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag gttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gtctactata tccactgggt gaagcagttg 120
actgagcagg gcctagaatg gattggaagg attgatcctg aaaatgggtg aactaagtat 180
gtccccaaat tccagggcaa ggccacttta acagtagaca catcctccaa cacagcctac 240
ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac actggcgtct attactgtgt tacctcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 37
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 37
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Ala Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 38
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtcg ctcttggaaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcattcactta ttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctctctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagatcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggcagagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 39
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Lys Gln Leu Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Leu Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val ser ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 40
<211> 336
<212> ADN

<213> Mus muscularis

<400> 40
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag gttctggcctt caacattaag gtctactatg ttcactggct gaagcagttg 120
actgagcagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg agaatggtga aactctatac 180
accccgaaat tccagggcaa ggccactttg acagtagaca catcatcaa cacagcctac 240
ctgcagctca acagcctgac atctgaggac actgccgtct attattgtgt tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcacctc tctcacagtc tcttca 336

<210> 41
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 41
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 42
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 42
gatattgtga tgacgcagtc tgcattctcc aatccagtc cttcttgaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagcaa gagtctccta cataggaatg gcatcaccta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgac caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac tctgaaaac 240
agcagagtgg aggcctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 43
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 43
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Leu Lys Gln Arg Thr Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Lys Phe Gly Pro Lys Phe
50 55 60
Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ser
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Thr Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser Ser
100 105 110

<210> 44
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus muscularis

-201-

```
<400> 44
gagggttcagc tgcagcagtc tggggcagag tttgtgaggc cagggggcctc agtcaagtta 60
tcctgcacag cttctggctt caacattaaa acctactata tactctggct gaaacagagg 120
actgaccagg gcctggagtg gattggaagg attgatcccg aggatgggta aactaaattt 180
ggccccgaaat tccggggcaa ggccacttta acagcagaca catcctccaa cacagcctcc 240
ctacaactca gcagtctgac atctgaggac actggcgtct attactgtgt tacctcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctctcagtc tcctca 336
```

```
<210> 45
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis
```

```
<400> 45
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
```

```
<210> 46
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis
```

```
<400> 46
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcctcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gctctctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagttc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcgggt gaggcaccaa gctggaaatc aaa 336
```

```
<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis
```

```
<400> 47
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Lys Gln Leu Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110
```

```
<210> 48
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus muscularis
```

<400> 48
gagggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag gttctggctt caacattaag gtctactatg tgcactggct gaagcagttg 120
actgagcagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg aaaatgggtga aactaaatat 180
gccccgaaat tccaggacaa ggccactttg acagtagaca catcctccaa tacagcctac 240
cttcacctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attattgtgt tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 49
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 49
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 50
gacattgtga tgacgcagtc tgcattctcc aatccagtc cttcttgaac atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta cataggaatg gcatcaccta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcctgattt atcagatgct caaccttgcc 180
tcaggagttc cagacagggt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac tctgaaaatc 240
agcagagtgg aggcagagga tgtgggtgtt tattattgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis

<400> 51
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Lys Gln Leu Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Leu Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 52
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus muscularis

<400> 52

```
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtggagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag gttctggcct caacattaag gtctactatg ttcactggct gaagcagttg 120
actgagcagg gccttggaatg gatttgaagg attgatcctg agaattggtg aactctatat 180
accccgaat tccagggcaa ggccactttt acagtagaca catcatccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attatttgtg tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336
```

<210> 53
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus muscularis

```
<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1      5      10      15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20     25     30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85     90     95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105    110
```

<210> 54
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus muscularis

```
<400> 54
gatattgtga tgacgcagtc tgcattctcc aatccagtc cttcttggaa atcagcttcc 60
atctcttgca ggtctagcaa gagtctccta cataggaatg gcatcaccta ttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac tctgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcgggt gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333
```

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus muscularis

```
<400> 55
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20     25     30
Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Leu Thr Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35     40     45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Gln Tyr Ala Pro Lys Phe
50     55     60
Gln Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100    105    110
```

<210> 56
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus muscularis

```
<400> 56
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
```

```

tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gactactata tgcactgggt gaagcagttg 120
actgagcagg gcctggaatg gattggaagg attgatcctg aaaatgggtg aactcaatat 180
gccccgaaat tccagggcaa ggcctcttta acagcagaca catcctccaa cacagcctac 240
cttcacctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgt tagttcgggc 300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcttca 336

```

<210> 57
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus muscularis

```

<400> 57
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1      5      10      15
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20     25     30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35     40     45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50     55     60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85     90     95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105    110

```

<210> 58
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus muscularis

```

<400> 58
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttgggaac atcagcttcc 60
atctcttgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta ttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tgtgggtgtt tattactgtg ctcaaaatct agaactttgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

```

<210> 59
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aa de cadena pesada de H48

```

<400> 59
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile His Val Tyr
20     25     30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35     40     45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50     55     60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100    105    110

```

<210> 60
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN de cadena pesada de H48

<400> 60
caggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgag gtgaaagaac ccggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg gcagcggctt caacatccac gtgtactacg tgcactggct gaggcagctg 120
cccgagaagg gcctggagtg gattggcagg atcgaccccg agaacggcga gaccatctac 180
acccccaagt tccaggacaa ggccaccctg accgtggaca ccagcaccga caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gtccgaggat accgccgtct actactgcgt gagcagcggg 300
tattggggcc agggcacact agtgaccgtg tccagc 336

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena pesada de H49

<400> 61
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Thr Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 62
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN de cadena pesada de H49

<400> 62
caggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgag gtgaaagaac ccggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg gcagcggctt caacatcaaa acctactacg tgcactggct gaggcagctg 120
cccgagaagg gcctggagtg gattggcagg atcgaccccg agaacggcga gaccatctac 180
acccccaagt tccaggacaa ggccaccctg accgtggaca ccagcaccga caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gtccgaggat accgccgtct actactgcgt gagcagcggg 300
tattggggcc agggcacact agtgaccgtg tccagc 336

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena pesada de H50

<400> 63
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Asn Ile His Val Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 64
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN de cadena pesada de H50

<400> 64
caggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgag gtgaaagaac ccggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaccg gcagcggctt caacatccac gtgtactacg tgcactggct gaggcagctg 120
cccgagaagg gcctggagtg gattggcagg atcgaccccg agaacggcga gaccatctac 180
acccccaagt tccaggacaa ggccaccctg accgtggaca ccagcaccga caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gtccgaggat accgccgtct actactgcgt gacgagcggg 300
tattggggcc agggcacact agtgaccgtg tccagc 336

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena pesada de H51

<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile His Thr Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Leu Arg Gln Leu Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Ile Tyr Thr Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ser Ser Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 66
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN de cadena pesada de H51

<400> 66
caggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgag gtgaaagaac ccggcgccag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg gcagcggctt caacatccac acctactacg tgcactggct gaggcagctg 120
cccgagaagg gcctggagtg gattggcagg atcgaccccg agaacggcga gaccatctac 180
acccccaagt tccaggacaa ggccaccctg accgtggaca ccagcaccga caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gtccgaggat accgccgtct actactgcgt gacgagcggg 300
tattggggcc agggcacact agtgaccgtg tccagc 336

<210> 67
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena ligera de L19

<400> 67
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Asp His Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 68
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN de cadena ligera de L19

<400> 68
 gacatcgtga tgaccagag cccactgagc aatcccgtga ctcccggcga gcccgcctca 60
 atcagctgca ggagcagcaa gagcctgctg cacaggaacg gcaagacctt cctgtactgg 120
 tatctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct accagatgga ccacctggcc 180
 agcggcgtgc ccgaccggtt ctctagcagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 agcagggctg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgca ccagaaacct ggagctctgg 300
 accttcggcc agggcaccac ggtggagatc aaa 333

<210> 69
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> aa de cadena ligera de L20

<400> 69
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Asp His Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 70
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ADN de cadena ligera de L20

<400> 70
 gacatcgtga tgaccagag cccactgagc aatcccgtga ctcccggcga gcccgcctca 60
 atcagctgca ggagcagcaa gagcctgctg cacaggaacg gcatcaccta cctgtactgg 120
 tatctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct accagatgga ccacctggcc 180
 agcggcgtgc ccgaccggtt ctctagcagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240

agcagggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcg cccagaacct ggagctctgg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 71
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aa de cadena ligera de L21

<400> 71
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asn Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Arg
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Asp Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95
Leu Glu Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> ADN de cadena ligera de L21

<400> 72
gacatcgtga tgacccagag cccactgagc aatcccgtga ctcccggcga gcccgcctca 60
atcagctgca ggagcagcaa gagcctgctg cacaggaacg gcaagaccta cctgtactgg 120
tatctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct accagatgga caacctggcc 180
agcggcgtgc ccgaccggtt ctctagcagc ggaagcggca ccgacttcac cctgaagatc 240
agcagggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgcg cccagaacct ggagctctgg 300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 73
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Conjugado peptídico que contiene restos de beta amiloide
22-38 usado para inmunización y tamizado

<400> 73
Cys Gly Gly Gly Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
1 5 10 15
Leu Met Val Gly Gly
20

NO PRESENTAR

Listado de referencia de los números de las secuencias

- 1 aa de CDRH1
- 2 aa de CDRH2
- 3 aa de CDRH3
- 4 aa de CDRL1
- 5 aa de CDRL2
- 6 aa de CDRL3
- 7 aa del conjugado peptídico que se usa para inmunización y tamizado
que contiene los restos de beta amiloide 27-38
- 8 aa del péptido para ensayo 24-34
- 9 Péptido de mapeo de epítomos 28-35
- 10 péptido de mapeo de epítomos 24-35
- 11 péptido de mapeo de epítomos 28-39
- 12 péptido de mapeo de epítomos 31-42
- 13 aa del V_H receptor (IG4V1-24)
- 14 ADN del V_H receptor (IG4V1-24)
- 15 aa del minigen JH4

- 16 aa del V_L receptor (IGKV2-28)
- 17 ADN del V_L receptor (IGKV2-28)
- 18 aa del minigen JK-1
- 19 aa del V_H de 6F6
- 20 ADN de V_H de 6F6
- 21 aa de V_L de 6F6
- 22 ADN de V_L de 6F6
- ADN de V_H de H11
- 24 aa de V_H de H11
- 25 ADN de V_L L9
- 26 aa de V_L L9
- 27 aa de la cadena pesada de H11
- 28 aa de la cadena ligera de L9
- 29 ADN de la cadena pesada de H11 (optimizado)
- 30 ADN de la cadena ligera de L9 (optimizado)
- 31 aa de V_H de 2C1
- 32 ADN de V_H de 2C1
- 33 aa de V_L de 2C1

- 34 ADN de V_L de 2C1
- 35 aa de V_H de 2C1
- 36 ADN de V_H de 2E11
- 37 aa de V_L de 2E11
- 38 ADN de V_L de 2E11
- 39 aa de V_H de 4D4
- 40 ADN de V_H de 4D4
- 41 aa de V_L de 4D4
- 42 ADN de V_L de 4D4
- 43 aa de V_H de 5C9
- 44 ADN de V_H de 5C9
- 45 aa de V_L de 5C9
- 46 ADN de V_L de 5C9
- 47 aa de V_H de 5D1
- 48 ADN de V_H de 5D1
- 49 aa de V_L de 5D1
- 50 ADN de V_L de 5D1

- 51 aa de V_H de 14B3
- 52 ADN de V_H de 14B3
- 53 aa de V_L de 14B3
- 54 ADN de V_L de 14B3
- 55 aa de V_H de 16D4
- 56 ADN de V_H de 16D4
- 57 aa de V_L de 16D4
- 58 ADN de V_L de 16D4
- 59 aa de V_H de H48
- 60 ADN de V_H de H48
- 61 aa de V_H de H49
- 62 ADN de V_H de H49
- 63 aa de V_H de H50
- 64 ADN de V_H de H50
- 65 aa de V_H de H51
- 66 ADN de V_H de H51
- 67 aa de V_L de L19
- 68 ADN de V_L de L19

Figura 1



PB62764

Figura 2

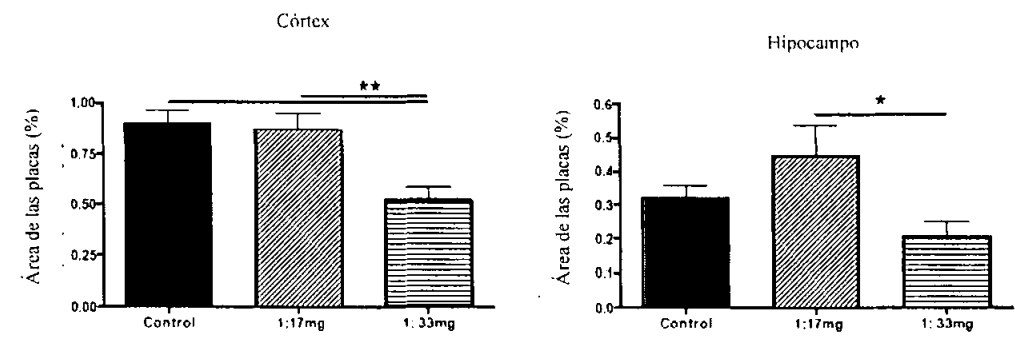


Figura 3

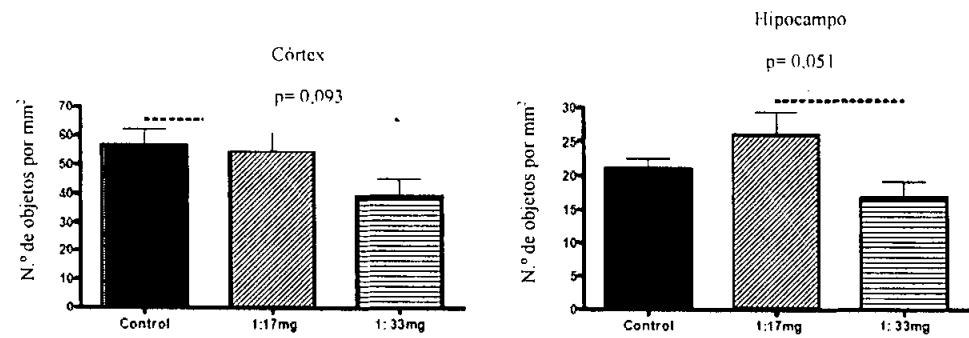


Figura 4

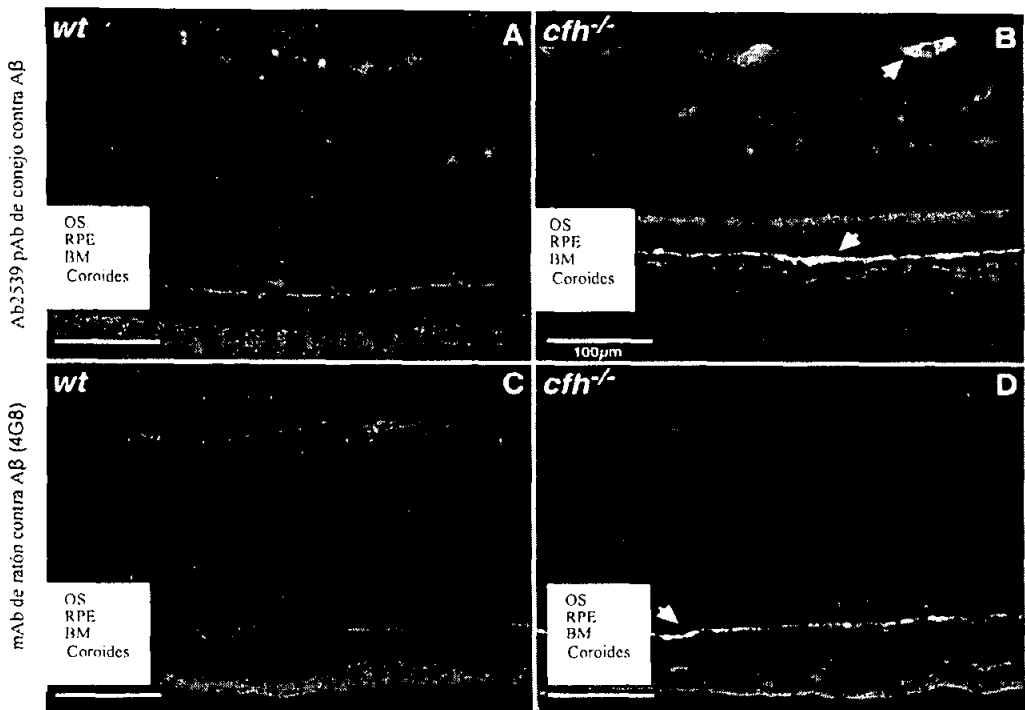
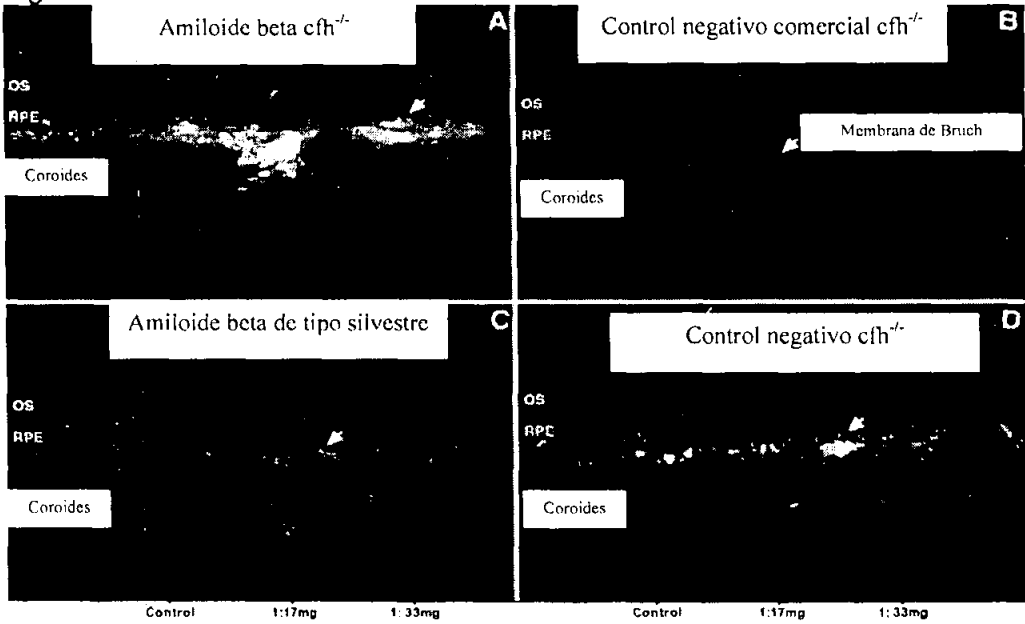


Figura 5



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Unica

- ☒ Indicación que se solicita una PCT (1)
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) (31)
 - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes (244)
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento) (2)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	10 068844
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/067138
	Fecha inicio fase nacional	11/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10333

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

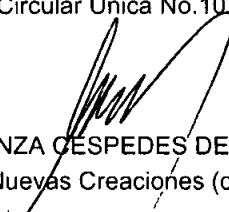
Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 068844



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

13 AGO. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

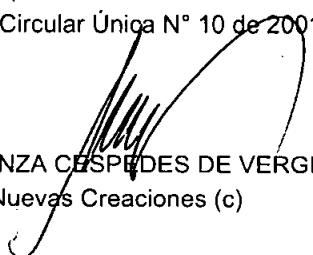
Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	10 068844
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/067138
	Fecha inicio fase nacional	11/07/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10334

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

13 ABO. 2020