Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD

21. **EXPEDIENTE No.** 03-56705.

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN EL PEPTIDO AMILOIDE BETA

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 16/18; A61K 39/395.

71. **SOLICITANTE** NEUROLAB LIMITED Y WYETH

DOMICILIO Smiths, Bermuda y Madison New Jersey, Estados Unidos de América

74. **APODERADO** Emilio Forero.
Código No. 1092

22. **BOGOTÁ, D. C.,** _____

(FORMA P-10)

OFICINA DE COMUNICACIONES

96375 -Imprenta nacional de Colombia- 2006

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03056705 00000000 Folios: 358
Fecha (AMD): 2003-07-04 17:58:54
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

03 056705 00

FORMULARIO UNICO 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: **NEURALAB LIMITED Y WYETH**
sociedades constituidas y existentes bajo las leyes de Bermuda y del Estado de New Jersey, Estados Unidos de América, respectivamente

Dirección: 102 St. James Court, Flatts, Smiths, FL04 Bermuda

Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América,

Domicilio: Smiths, Bermuda y Madison, New Jersey, Estados Unidos de América, respectivamente

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____

Número: _____

3 **REPRESENTANTE O APODERADO**

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax:: 217 92 11
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____

Número: 438.019 T.P. 31.929

4 **INVENTOR (ES) (72)**

1- **Guriq BASI**
514 Rhoades Drive,
Palo Alto, California 94303,
Estados Unidos de América

2- **Jose SALDANHA**
22A Lincoln Way, Enfield,
Middlesex EN1 1TE,
Reino Unido

3- **Ted YEDNOCK**
184 Arroyo Road,
Forest Knolls, California 94933,
Estados Unidos de América

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US01/46587 Fecha: 6 de diciembre de 2001
Publicación Internacional No. WO 02/46237 A2 Fecha : 13 de junio de 2002

CAVELIER ABOGADOS- Colo 13798-841-001-5 MRM/vgc-ID-1

6 **Título (54)** ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN EL PÉPTIDO AMILOIDEO BETA

7 **Clasificación Internacional (51)** C07K 16/18 ; A61P 25/28 ; A61K 39/395 ; C12N 15/13, 15/85.

8 **Prioridad** SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	6 de diciembre de 2000	60/251.892

9 **Comprobante de pago No.:** 03- 44.021 **Fecha:** 24 de junio de 2003

10 **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 400.000
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, de **NEURALAB LIMITED**
- ☐ 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 examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 **FIGURA CARACTERISTICA:**

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

MRE/VGC-id-1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/46237 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K 16/18, A61P 25/28, A61K 39/395, C12N 15/13, 15/85, 5/10

(21) International Application Number: PCT/US01/46587

(22) International Filing Date: 6 December 2001 (06.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/251,892 6 December 2000 (06.12.2000) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: NEURALAB LIMITED [—/—]; 102 St. James Court, Flatts, Smiths, FL04 (BM). WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: BASI, Guriq [US/US]; 514 Rhoades Drive, Palo Alto, CA 94303 (US). SALDANHA, Jose [GB/GB]; 22A Lincoln Way, Enfield, Middlesex EN1 1TE (GB). YEDNOCK, Ted [US/US]; 184 Arroyo Road, Forest Knolls, CA 94933 (US).

(74) Agents: MANDRAGOURAS, Amy, E. et al.; Lahive & Cockfield, LLP, 28 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/46237 A2

(54) Title: HUMANIZED ANTIBODIES THAT RECOGNIZE BETA AMYLOID PEPTIDE

(57) Abstract: The invention provides improved agents and methods for treatment of diseases associated with amyloid deposits of Aß in the brain of a patient. Preferred agents include humanized antibodies.

HUMANIZED ANTIBODIES THAT RECOGNIZE BETA AMYLOID PEPTIDE

Related Applications

This application claims the benefit of prior-filed provisional patent application U.S. Serial No. 60/251,892 (filed December 6, 2000) entitled "Humanized Antibodies That Recognize Beta-Amyloid Peptide". The entire content of the above-referenced application is incorporated herein by reference.

Background of the Invention

Alzheimer's disease (AD) is a progressive disease resulting in senile dementia. *See generally* Selkoe, *TINS* 16:403 (1993); Hardy *et al.*, WO 92/13069; Selkoe; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:438 (1994); Duff *et al.*, *Nature* 373:476 (1995); Games *et al.*, *Nature* 373:523 (1995). Broadly speaking, the disease falls into two categories: late onset, which occurs in old age (65 + years) and early onset, which develops well before the senile period, *i.e.*, between 35 and 60 years. In both types of disease, the pathology is the same but the abnormalities tend to be more severe and widespread in cases beginning at an earlier age. The disease is characterized by at least two types of lesions in the brain, neurofibrillary tangles and senile plaques. Neurofibrillary tangles are intracellular deposits of microtubule associated tau protein consisting of two filaments twisted about each other in pairs. Senile plaques (*i.e.*, amyloid plaques) are areas of disorganized neuropil up to 150 μm across with extracellular amyloid deposits at the center which are visible by microscopic analysis of sections of brain tissue. The accumulation of amyloid plaques within the brain is also associated with Down's syndrome and other cognitive disorders.

The principal constituent of the plaques is a peptide termed Aβ or β-amyloid peptide. Aβ peptide is a 4-kDa internal fragment of 39-43 amino acids of a larger transmembrane glycoprotein named protein termed amyloid precursor protein (APP). As a result of proteolytic processing of APP by different secretase enzymes, Aβ is primarily found in both a short form, 40 amino acids in length, and a long form, ranging from 42-43 amino acids in length. Part of the hydrophobic transmembrane domain of APP is found at the carboxy end of Aβ, and may account for the ability of Aβ to aggregate into plaques, particularly in the case of the long form. Accumulation of

amyloid plaques in the brain eventually leads to neuronal cell death. The physical symptoms associated with this type of neural deterioration characterize Alzheimer's disease.

Several mutations within the APP protein have been correlated with the presence of Alzheimer's disease. See, *e.g.*, Goate *et al.*, *Nature* 349:704) (1991) (valine^{717} to isoleucine); Chartier Harlan *et al. Nature* 353:844 (1991)) (valine^{717} to glycine); Murrell *et al.*, *Science* 254:97 (1991) (valine^{717} to phenylalanine); Mullan *et al.*, *Nature Genet.* 1:345 (1992) (a double mutation changing lysine^{595}-methionine^{596} to asparagine^{595}-leucine^{596}). Such mutations are thought to cause Alzheimer's disease by increased or altered processing of APP to Aβ, particularly processing of APP to increased amounts of the long form of Aβ (*i.e.*, Aβ1-42 and Aβ1-43). Mutations in other genes, such as the presenilin genes, PS1 and PS2, are thought indirectly to affect processing of APP to generate increased amounts of long form Aβ (see Hardy, *TINS* 20: 154 (1997)).

Mouse models have been used successfully to determine the significance of amyloid plaques in Alzheimer's (Games *et al.*, *supra*, Johnson-Wood *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550 (1997)). In particular, when PDAPP transgenic mice, (which express a mutant form of human APP and develop Alzheimer's disease at a young age), are injected with the long form of Aβ, they display both a decrease in the progression of Alzheimer's and an increase in antibody titers to the Aβ peptide (Schenk *et al.*, *Nature* 400, 173 (1999)). The observations discussed above indicate that Aβ, particularly in its long form, is a causative element in Alzheimer's disease.

McMichael, EP 526,511, proposes administration of homeopathic dosages (less than or equal to 10^{-2} mg/day) of Aβ to patients with preestablished AD. In a typical human with about 5 liters of plasma, even the upper limit of this dosage would be expected to generate a concentration of no more than 2 pg/ml. The normal concentration of Aβ in human plasma is typically in the range of 50-200 pg/ml (Seubert *et al.*, *Nature* 359:325 (1992)). Because EP 526,511's proposed dosage would barely alter the level of endogenous circulating Aβ and because EP 526,511 does not recommend use of an adjuvant, as an immunostimulant, it seems implausible that any therapeutic benefit would result.

Accordingly, there exists the need for new therapies and reagents for the treatment of Alzheimer's disease, in particular, therapies and reagents capable of effecting a therapeutic benefit at physiologic (*e.g.*, non-toxic) doses.

Summary of the Invention

The present invention features new immunological reagents, in particular, therapeutic antibody reagents for the prevention and treatment of amyloidogenic disease (*e.g.*, Alzheimer's disease). The invention is based, at least in part, on the identification and characterization of two monoclonal antibodies that specifically bind to Aβ peptide and are effective at reducing plaque burden and/or reducing the neuritic dystrophy associated with amyloidogenic disorders. Structural and functional analysis of these antibodies leads to the design of various humanized antibodies for prophylactic and/or therapeutic use. In particular, the invention features humanization of the variable regions of these antibodies and, accordingly provides for humanized immunoglobulin or antibody chains, intact humanized immunoglobulins or antibodies, and functional immunoglobulin or antibody fragments, in particular, antigen binding fragments, of the featured antibodies.

Polypeptides comprising the complementarity determining regions of the featured monoclonal antibodies are also disclosed, as are polynucleotide reagents, vectors and host suitable for encoding said polypeptides.

Methods of treatment of amyloidogenic diseases or disorders (*e.g.*, Alzheimer's disease) are disclosed, as are pharmaceutical compositions and kits for use in such applications.

Also featured are methods of identifying residues within the featured monoclonal antibodies which are important for proper immunologic function and for identifying residues which are amenable to substitution in the design of humanized antibodies having improved binding affinities and/or reduced immunogenicity, when used as therapeutic reagents.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts an alignment of the amino acid sequences of the light chain of mouse 3D6, humanized 3D6, Kabat ID 109230 and germline A19 antibodies.

CDR regions are indicated by arrows. Bold italics indicate rare murine residues. Bold indicates packing (VH + VL) residues. Solid fill indicates canonical/CDR interacting residues. Asterisks indicate residues selected for backmutation in humanized 3D6, version 1.

Figure 2 depicts an alignment of the amino acid sequences of the heavy chain of mouse 3D6, humanized 3D6, Kabat ID 045919 and germline VH3-23 antibodies. Annotation is the same as for Figure 1.

Figure 3 graphically depicts the Aβ binding properties of 3D6, chimeric 3D6 and 10D5. *Figure 3A* is a graph depicting binding of Aβ to chimeric 3D6 (PK1614) as compared to murine 3D6. *Figure 3B* is a graph depicting competition of biotinylated 3D6 versus unlabeled 3D6, PK1614 and 10D5 for binding to Aβ.

Figure 4 depicts a homology model of 3D6 VH and VL, showing α-carbon backbone trace. VH is shown in as a stippled line, and VL is shown as a solid line. CDR regions are indicated in ribbon form.

Figure 5 graphically depicts the Aβ binding properties of chimeric 3D6 and humanized 3D6. *Figure 5A* depicts ELISA results measuring the binding of humanized 3D6v1 and chimeric 3D6 to aggregated Aβ. *Figure 5B* depicts ELISA results measuring the binding of humanized 3D6v1 and humanized 3D6v2 to aggregated Aβ.

Figure 6 is a graph quantitating the binding of humanized 3D6 and chimeric 3D6 to Aβ plaques from brain sections of PDAPP mice.

Figure 7 is a graph showing results of a competitive binding assay testing the ability of humanized 3D6 versions 1 and 2, chimeric 3D6, murine 3D6, and 10D5 to compete with murine 3D6 for binding to Aβ.

Figure 8 graphically depicts of an *ex vivo* phagocytosis assay testing the ability of humanized 3D6v2, chimeric 3D6, and human IgG to mediate the uptake of Aβ by microglial cells.

Figure 9 depicts an alignment of the10D5 VL and 3D6 VL amino acid sequences. Bold indicates residues that match 10D5 exactly.

Figure 10 depicts an alignment of the10D5 VH and 3D6 VH amino acid sequences. Bold indicates residues that match 10D5 exactly.

Detailed Description of the Invention

The present invention features new immunological reagents and methods for preventing or treating Alzheimer's disease or other amyloidogenic diseases. The invention is based, at least in part, on the characterization of two monoclonal immunoglobulins, 3D6 and 10D5, effective at binding beta amyloid protein (Aβ) (*e.g.*, binding soluble and/or aggregated Aβ), mediating phagocytosis (*e.g.*, of aggregated Aβ), reducing plaque burden and/or reducing neuritic dystrophy (*e.g.*, in patient). The invention is further based on the determination and structural characterization of the primary and secondary structure of the variable light and heavy chains of these immunoglobulins and the identification of residues important for activity and immunogenicity.

Immunoglobulins are featured which include a variable light and/or variable heavy chain of the preferred monoclonal immunoglobulins described herein. Preferred immunoglobulins, *e.g.*, therapeutic immunoglobulins, are featured which include a humanized variable light and/or humanized variable heavy chain. Preferred variable light and/or variable heavy chains include a complementarity determining region (CDR) from the monoclonal immunoglobulin (*e.g.*, donor immunoglobulin) and variable framework regions substantially from a human acceptor immunoglobulin. The phrase "substantially from a human acceptor immunoglobulin" means that the majority or key framework residues are from the human acceptor sequence, allowing however, for substitution of residues at certain positions with residues selected to improve activity of the humanized immunoglobulin (*e.g.*, alter activity such that it more closely mimics the activity of the donor immunoglobulin) or selected to decrease the immunogenicity of the humanized immunoglobulin.

In one embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 3D6 variable region complementarity determining regions (CDRs) (*i.e.*, includes one, two or three CDRs from the light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2 or includes one, two or three CDRs from the heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4), and includes a variable framework region substantially from a human acceptor immunoglobulin light or heavy

chain sequence, provided that at least one residue of the framework residue is backmutated to a corresponding murine residue, wherein said backmutation does not substantially affect the ability of the chain to direct Aβ binding.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 3D6 variable region complementarity determining regions (CDRs) (*e.g.*, includes one, two or three CDRs from the light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2 and/or includes one, two or three CDRs from the heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4), and includes a variable framework region substantially from a human acceptor immunoglobulin light or heavy chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light or heavy chain variable region sequence, where the framework residue is selected from the group consisting of (a) a residue that non-covalently binds antigen directly; (b) a residue adjacent to a CDR; (c) a CDR-interacting residue (*e.g.*, identified by modeling the light or heavy chain on the solved structure of a homologous known immunoglobulin chain); and (d) a residue participating in the VL-VH interface.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 3D6 variable region CDRs and variable framework regions from a human acceptor immunoglobulin light or heavy chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light or heavy chain variable region sequence, where the framework residue is a residue capable of affecting light chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the variable region, for example a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, an unusual residue, or a glycoslyation site residue on the surface of the structural model.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light chain that includes 3D6 variable region CDRs (*e.g.*, from the 3D6 light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2), and includes a human acceptor immunoglobulin variable framework region, provided that at least one

framework residue selected from the group consisting of L1, L2, L36 and L46 (Kabat numbering convention) is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light chain variable region sequence. In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin heavy chain that includes 3D6 variable region CDRs (*e.g.*, from the 3D6 heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4), and includes a human acceptor immunoglobulin variable framework region, provided that at least one framework residue selected from the group consisting of H49, H93 and H94 (Kabat numbering convention) is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 heavy chain variable region sequence.

Preferred light chains include kappa II framework regions of the subtype kappa II (Kabat convention), for example, framework regions from the acceptor immunoglobulin Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 and Kabat ID U41645. Preferred heavy chains include framework regions of the subtype III (Kabat convention), for example, framework regions from the acceptor immunoglobulin Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 and Kabat ID M23691.

In one embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 10D5 variable region complementarity determining regions (CDRs) (*i.e.*, includes one, two or three CDRs from the light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14 or includes one, two or three CDRs from the heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:16), and includes a variable framework region substantially from a human acceptor immunoglobulin light or heavy chain sequence, provided that at least one residue of the framework residue is backmutated to a corresponding murine residue, wherein said backmutation does not substantially affect the ability of the chain to direct Aβ binding.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 10D5 variable region complementarity determining regions (CDRs) (*e.g.*, includes one, two or three CDRs from the light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14 and/or includes one, two or three CDRs from the heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:16), and includes a variable framework region substantially from a human acceptor immunoglobulin light or heavy chain sequence, provided that at least one

framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light or heavy chain variable region sequence, where the framework residue is selected from the group consisting of (a) a residue that non-covalently binds antigen directly; (b) a residue adjacent to a CDR; (c) a CDR-interacting residue (*e.g.*, identified by modeling the light or heavy chain on the solved structure of a homologous known immunoglobulin chain); and (d) a residue participating in the VL-VH interface.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin light or heavy chain that includes 10D5 variable region CDRs and variable framework regions from a human acceptor immunoglobulin light or heavy chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 light or heavy chain variable region sequence, where the framework residue is a residue capable of affecting light chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the variable region, for example a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, an unusual residue, or a glycosylation site residue on the surface of the structural model.

In another embodiment, the invention features, in addition to the substitutions described above, a substitution of at least one rare human framework residue. For example, a rare residue can be substituted with an amino acid residue which is common for human variable chain sequences at that position. Alternatively, a rare residue can be substituted with a corresponding amino acid residue from a homologous germline variable chain sequence (*e.g.*, a rare light chain framework residue can be substituted with a corresponding germline residue from an A1, A17, A18, A2, or A19 germline immunoglobulin sequence or a rare heavy chain framework residue can be substituted with a corresponding germline residue from a VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 or VH3-11 germline immunoglobulin sequence.

In another embodiment, the invention features a humanized immunoglobulin that includes a light chain and a heavy chain, as described above, or an antigen-binding fragment of said immunoglobulin. In an exemplary embodiment, the humanized immunoglobulin binds (*e.g.*, specifically binds) to beta amyloid peptide (Aβ)

with a binding affinity of at least 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, or 10^9 M^{-1}. In another embodiment, the immunoglobulin or antigen binding fragment includes a heavy chain having isotype γ1. In another embodiment, the immunoglobulin or antigen binding fragment binds (*e.g.*, specifically binds) to both soluble beta amyloid peptide (Aβ) and aggregated Aβ. In another embodiment, the immunoglobulin or antigen binding fragment mediates phagocytosis (*e.g.*, induces phagocytosis) of beta amyloid peptide (Aβ). In yet another embodiment, the immunoglobulin or antigen binding fragment crosses the blood-brain barrier in a subject. In yet another embodiment, the immunoglobulin or antigen binding fragment reduces both beta amyloid peptide (Aβ) burden and neuritic dystrophy in a subject.

In another embodiment, the invention features chimeric immunoglobulins that include 3D6 variable regions (*e.g.*, the variable region sequences set forth as SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4). In yet another embodiment, the invention features an immunoglobulin, or antigen-binding fragment thereof, including a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:8 and a variable light chain region as set forth in SEQ ID NO:5. In yet another embodiment, the invention features an immunoglobulin, or antigen-binding fragment thereof, including a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:12 and a variable light chain region as set forth in SEQ ID NO:11. In another embodiment, the invention features chimeric immunoglobulins that include 10D5 variable regions (*e.g.*, the variable region sequences set forth as SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16). In yet another embodiment, the immunoglobulin, or antigen-binding fragment thereof, further includes constant regions from IgG1.

The immunoglobulins described herein are particularly suited for use in therapeutic methods aimed at preventing or treating amyloidogenic diseases. In one embodiment, the invention features a method of preventing or treating an amyloidogenic disease (*e.g.*, Alzheimer's disease) that involves administering to the patient an effective dosage of a humanized immunoglobulin as described herein. In another embodiment, the invention features pharmaceutical compositions that include a humanized immunoglobulin as described herein and a pharmaceutical carrier. Also featured are isolated nucleic acid molecules, vectors and host cells for producing the immunoglobulins or immunoglobulin fragments or chains described herein, as well as

methods for producing said immunoglobulins, immunoglobulin fragments or immunoglobulin chains

The present invention further features a method for identifying 3D6 or 10D5 residues amenable to substitution when producing a humanized 3D6 or 10D5 immunoglobulin, respectively. For example, a method for identifying variable framework region residues amenable to substitution involves modeling the three-dimensional structure of the 3D6 or 10D5 variable region on a solved homologous immunoglobulin structure and analyzing said model for residues capable of affecting 3D6 or 10D5 immunoglobulin variable region conformation or function, such that residues amenable to substitution are identified. The invention further features use of the variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, or any portion thereof, in producing a three-dimensional image of a 3D6 immunoglobulin, 3D6 immunoglobulin chain, or domain thereof. Also featured is the use of the variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16, or any portion thereof, in producing a three-dimensional image of a 10D5 immunoglobulin, 10D5 immunoglobulin chain, or domain thereof.

Prior to describing the invention, it may be helpful to an understanding thereof to set forth definitions of certain terms to be used hereinafter.

The term "immunoglobulin" or "antibody" (used interchangeably herein) refers to an antigen-binding protein having a basic four-polypeptide chain structure consisting of two heavy and two light chains, said chains being stabilized, for example, by interchain disulfide bonds, which has the ability to specifically bind antigen. Both heavy and light chains are folded into domains. The term "domain" refers to a globular region of a heavy or light chain polypeptide comprising peptide loops (*e.g.*, comprising 3 to 4 peptide loops) stabilized, for example, by β-pleated sheet and/or intrachain disulfide bond. Domains are further referred to herein as "constant" or "variable", based on the relative lack of sequence variation within the domains of various class members in the case of a "constant" domain, or the significant variation within the domains of various class members in the case of a "variable" domain. "Constant" domains on the light chain are referred to interchangeably as "light chain constant regions", "light chain constant domains", "CL" regions or "CL" domains). "Constant" domains on the heavy

chain are referred to interchangeably as "heavy chain constant regions"; "heavy chain constant domains", "CH" regions or "CH" domains). "Variable" domains on the light chain are referred to interchangeably as "light chain variable regions", "light chain variable domains", "VL" regions or "VL" domains). "Variable" domains on the heavy chain are referred to interchangeably as "heavy chain constant regions", "heavy chain constant domains", "CH" regions or "CH" domains).

The term "region" refers to a part or portion of an antibody chain and includes constant or variable domains as defined herein, as well as more discrete parts or portions of said domains. For example, light chain variable domains or regions include "complementarity determining regions" or "CDRs" interspersed among "framework regions" or "FRs", as defined herein.

Immunoglobulins or antibodies can exist in monomeric or polymeric form. The term "antigen-binding fragment" refers to a polypeptide fragment of an immunoglobulin or antibody binds antigen or competes with intact antibody (*i.e.*, with the intact antibody from which they were derived) for antigen binding (*i.e.*, specific binding). The term "conformation" refers to the tertiary structure of a protein or polypeptide (*e.g.*, an antibody, antibody chain, domain or region thereof). For example, the phrase "light (or heavy) chain conformation" refers to the tertiary structure of a light (or heavy) chain variable region, and the phrase "antibody conformation" or "antibody fragment conformation" refers to the tertiary structure of an antibody or fragment thereof.

"Specific binding" of an antibody mean that the antibody exhibits appreciable affinity for antigen or a preferred epitope and, preferably, does not exhibit significant crossreactivity. "Appreciable" or preferred binding include binding with an affinity of at least 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 M^{-1}, or 10^{10} M^{-1}. Affinities greater than 10^7 M^{-1}, preferably greater than 10^8 M^{-1} are more preferred. Values intermediate of those set forth herein are also intended to be within the scope of the present invention and a preferred binding affinity can be indicated as a range of affinities, for example, 10^6 to 10^{10} M^{-1}, preferably 10^7 to 10^{10} M^{-1}, more preferably 10^8 to 10^{10} M^{-1}. An antibody that "does not exhibit significant crossreactivity" is one that will not appreciably bind to an undesirable entity (*e.g.*, an undesirable proteinaceous entity). For example, an antibody that specifically binds to Aβ will appreciably bind Aβ but will not significantly react

with non-Aβ proteins or peptides (*e.g.*, non-Aβ proteins or peptides included in plaques). An antibody specific for a preferred epitope will, for example, not significantly crossreact with remote epitopes on the same protein or peptide. Specific binding can be determined according to any art-recognized means for determining such binding. Preferably, specific binding is determined according to Scatchard analysis and/or competitive binding assays.

Binding fragments are produced by recombinant DNA techniques, or by enzymatic or chemical cleavage of intact immunoglobulins. Binding fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv, single chains, and single-chain antibodies. Other than "bispecific" or "bifunctional" immunoglobulins or antibodies, an immunoglobulin or antibody is understood to have each of its binding sites identical. A "bispecific" or "bifunctional antibody" is an artificial hybrid antibody having two different heavy/light chain pairs and two different binding sites. Bispecific antibodies can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, *e.g.*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

The term "humanized immunoglobulin" or "humanized antibody" refers to an immunoglobulin or antibody that includes at least one humanized immunoglobulin or antibody chain (*i.e.*, at least one humanized light or heavy chain). The term "humanized immunoglobulin chain" or "humanized antibody chain" (*i.e.*, a "humanized immunoglobulin light chain" or "humanized immunoglobulin heavy chain") refers to an immunoglobulin or antibody chain (*i.e.*, a light or heavy chain, respectively) having a variable region that includes a variable framework region substantially from a human immunoglobulin or antibody and complementarity determining regions (CDRs) (*e.g.*, at least one CDR, preferably two CDRs, more preferably three CDRs) substantially from a non-human immunoglobulin or antibody, and further includes constant regions (*e.g.*, at least one constant region or portion thereof, in the case of a light chain, and preferably three constant regions in the case of a heavy chain). The term "humanized variable region" (*e.g.*, "humanized light chain variable region" or "humanized heavy chain variable region") refers to a variable region that includes a variable framework region substantially from a human immunoglobulin or antibody and complementarity

determining regions (CDRs) substantially from a non-human immunoglobulin or antibody.

The phrase "substantially from a human immunoglobulin or antibody" or "substantially human" means that, when aligned to a human immunoglobulin or antibody amino sequence for comparison purposes, the region shares at least 80-90%, preferably 90-95%, more preferably 95-99% identity (*i.e.*, local sequence identity) with the human framework or constant region sequence, allowing, for example, for conservative substitutions, consensus sequence substitutions, germline substitutions, backmutations, and the like. The introduction of conservative substitutions, consensus sequence substitutions, germline substitutions, backmutations, and the like, is often referred to as "optimization" of a humanized antibody or chain. The phrase "substantially from a non-human immunoglobulin or antibody" or "substantially non-human" means having an immunoglobulin or antibody sequence at least 80-95%, preferably 90-95%, more preferably, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to that of a non-human organism, *e.g.*, a non-human mammal.

Accordingly, all regions or residues of a humanized immunoglobulin or antibody, or of a humanized immunoglobulin or antibody chain, except possibly the CDRs, are substantially identical to the corresponding regions or residues of one or more native human immunoglobulin sequences. The term "corresponding region" or "corresponding residue" refers to a region or residue on a second amino acid or nucleotide sequence which occupies the same (*i.e.*, equivalent) position as a region or residue on a first amino acid or nucleotide sequence, when the first and second sequences are optimally aligned for comparison purposes.

The terms "humanized immunoglobulin" or "humanized antibody" are not intended to encompass chimeric immunoglobulins or antibodies, as defined *infra*. Although humanized immunoglobulins or antibodies are chimeric in their construction (*i.e.*, comprise regions from more than one species of protein), they include additional features (*i.e.*, variable regions comprising donor CDR residues and acceptor framework residues) not found in chimeric immunoglobulins or antibodies, as defined herein.

The term "significant identity" means that two polypeptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 50-60% sequence identity, preferably 60-70% sequence identity,

more preferably 70-80% sequence identity, more preferably at least 80-90% identity, even more preferably at least 90-95% identity, and even more preferably at least 95% sequence identity or more (*e.g.*, 99% sequence identity or more). The term "substantial identity" means that two polypeptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 80-90% sequence identity, preferably 90-95% sequence identity, and more preferably at least 95% sequence identity or more (*e.g.*, 99% sequence identity or more). For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters. The terms "sequence identity" and "sequence identity" are used interchangeably herein.

Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection (*see generally* Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology). One example of algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (publicly accessible through the National Institutes of Health NCBI internet server). Typically, default program parameters can be used to perform the sequence comparison, although customized parameters can also be used. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (*see* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions. For purposes of classifying amino acids substitutions as conservative or nonconservative, amino acids are grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): leu, met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gln, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative substitutions involve substitutions between amino acids in the same class. Non-conservative substitutions constitute exchanging a member of one of these classes for a member of another.

Preferably, humanized immunoglobulins or antibodies bind antigen with an affinity that is within a factor of three, four, or five of that of the corresponding non-human antibody. For example, if the nonhuman antibody has a binding affinity of 10^9 M^{-1}, humanized antibodies will have a binding affinity of at least 3×10^9 M^{-1}, 4×10^9 M^{-1} or 10^9 M^{-1}. When describing the binding properties of an immunoglobulin or antibody chain, the chain can be described based on its ability to "direct antigen (*e.g.*, Aβ) binding". A chain is said to "direct antigen binding" when it confers upon an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) a specific binding property or binding affinity. A mutation (*e.g.*, a backmutation) is said to substantially affect the ability of a heavy or light chain to direct antigen binding if it affects (*e.g.*, decreases) the binding affinity of an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising said chain by at least an order of magnitude compared to that of the antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising an equivalent chain lacking said mutation. A mutation "does not substantially affect (*e.g.*, decrease) the ability of a chain to direct antigen binding" if it affects (*e.g.*, decreases) the binding affinity of an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising said chain by only a factor of two, three, or four of that of the antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising an equivalent chain lacking said mutation.

The term "chimeric immunoglobulin" or antibody refers to an immunoglobulin or antibody whose light and heavy chains are derived from different species. Chimeric immunoglobulins or antibodies can be constructed, for example by

genetic engineering, from immunoglobulin gene segments belonging to different species.

An "antigen" is an entity (*e.g.*, a protenaceous entity or peptide) to which an antibody specifically binds.

The term "epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which an immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) specifically binds. Epitopes can be formed both from contiguous amino acids or noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost on treatment with denaturing solvents. An epitope typically includes at least 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15 amino acids in a unique spatial conformation. Methods of determining spatial conformation of epitopes include, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, *e.g.*, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Antibodies that recognize the same epitope can be identified in a simple immunoassay showing the ability of one antibody to block the binding of another antibody to a target antigen, *i.e.*, a competitive binding assay. Competitive binding is determined in an assay in which the immunoglobulin under test inhibits specific binding of a reference antibody to a common antigen, such as Aβ. Numerous types of competitive binding assays are known, for example: solid phase direct or indirect radioimmunoassay (RIA), solid phase direct or indirect enzyme immunoassay (EIA), sandwich competition assay (see Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); solid phase direct biotin-avidin EIA (see Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); solid phase direct labeled assay, solid phase direct labeled sandwich assay (see Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); solid phase direct label RIA using I-125 label (see Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); solid phase direct biotin-avidin EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); and direct labeled RIA. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Typically, such an assay involves the use of purified antigen bound to a solid surface or cells bearing either of these, an unlabeled test immunoglobulin and a labeled reference immunoglobulin. Competitive inhibition is measured by determining the amount of

label bound to the solid surface or cells in the presence of the test immunoglobulin. Usually the test immunoglobulin is present in excess. Usually, when a competing antibody is present in excess, it will inhibit specific binding of a reference antibody to a common antigen by at least 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% or more.

An epitope is also recognized by immunologic cells, for example, B cells and/or T cells. Cellular recognition of an epitope can be determined by *in vitro* assays that measure antigen-dependent proliferation, as determined by ^{3}H-thymidine incorporation, by cytokine secretion, by antibody secretion, or by antigen-dependent killing (cytotoxic T lymphocyte assay).

Exemplary epitopes or antigenic determinants can be found within the human amyloid precursor protein (APP), but are preferably found within the Aβ peptide of APP. Multiple isoforms of APP exist, for example APP^{695} APP^{751} and APP^{770}. Amino acids within APP are assigned numbers according to the sequence of the APP^{770} isoform (see *e.g.*, GenBank Accession No. P05067, also set forth as SEQ ID NO:38). Aβ (also referred to herein as beta amyloid peptide and A-beta) peptide is a ~4-kDa internal fragment of 39-43 amino acids of APP (Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 and Aβ43). Aβ40, for example, consists of residues 672-711 of APP and Aβ42 consists of residues 673-713 of APP. As a result of proteolytic processing of APP by different secretase enzymes *iv vivo* or *in situ*, Aβ is found in both a "short form", 40 amino acids in length, and a "long form", ranging from 42-43 amino acids in length. Preferred epitopes or antigenic determinants, as described herein, are located within the N-terminus of the Aβ peptide and include residues within amino acids 1-10 of Aβ, preferably from residues 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 or 3-7 of Aβ42. Additional referred epitopes or antigenic determinants include residues 2-4, 5, 6, 7 or 8 of Aβ, residues 3-5, 6, 7, 8 or 9 of Aβ, or residues 4-7, 8, 9 or 10 of Aβ42.

The term "amyloidogenic disease" includes any disease associated with (or caused by) the formation or deposition of insoluble amyloid fibrils. Exemplary amyloidogenic diseases include, but are not limited to systemic amyloidosis, Alzheimer's disease, mature onset diabetes, Parkinson's disease, Huntington's disease, fronto-temporal dementia, and the prion-related transmissible spongiform encephalopathies (kuru and Creutzfeldt-Jacob disease in humans and scrapie and BSE in sheep and cattle, respectively). Different amyloidogenic diseases are defined or

characterized by the nature of the polypeptide component of the fibrils deposited. For example, in subjects or patients having Alzheimer's disease, β-amyloid protein (*e.g.*, wild-type, variant, or truncated β-amyloid protein) is the characterizing polypeptide component of the amyloid deposit. Accordingly, Alzheimer's disease is an example of a "disease characterized by deposits of Aβ" or a "disease associated with deposits of Aβ", *e.g.*, in the brain of a subject or patient. The terms "β-amyloid protein", "β-amyloid peptide", "β-amyloid", "Aβ" and "Aβ peptide" are used interchangeably herein.

The term "effective dose" or "effective dosage" is defined as an amount sufficient to achieve or at least partially achieve the desired effect. The term "therapeutically effective dose" is defined as an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications in a patient already suffering from the disease. Amounts effective for this use will depend upon the severity of the infection and the general state of the patient's own immune system.

The term "patient" includes human and other mammalian subjects that receive either prophylactic or therapeutic treatment.

"Soluble" or "dissociated" Aβ refers to non-aggregating or disaggregated Aβ polypeptide. "Insoluble" Aβ refers to aggregating Aβ polypeptide, for example, Aβ held together by noncovalent bonds. Aβ (*e.g.*, Aβ42) is believed to aggregate, at least in part, due to the presence of hydrophobic residues at the C-terminus of the peptide (part of the transmembrane domain of APP). One method to prepare soluble Aβ is to dissolve lyophilized peptide in neat DMSO with sonication. The resulting solution is centrifuged to remove any insoluble particulates.

I. Immunological and Therapeutic Reagents

Immunological and therapeutic reagents of the invention comprise or consist of immunogens or antibodies, or functional or antigen binding fragments thereof, as defined herein. The basic antibody structural unit is known to comprise a tetramer of subunits. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The amino-terminal portion of each chain includes a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal

portion of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function.

Light chains are classified as either kappa or lambda and are about 230 residues in length. Heavy chains are classified as gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ), or epsilon (ε), are about 450-600 residues in length, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Both heavy and light chains are folded into domains. The term "domain" refers to a globular region of a protein, for example, an immunoglobulin or antibody. Immunoglobulin or antibody domains include, for example, 3 or four peptide loops stabilized by β-pleated sheet and an interchain disulfide bond. Intact light chains have, for example, two domains (V_L and C_L) and intact heavy chains have, for example, four or five domains (V_H, C_H1, C_H2, and C_H3).

Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 10 more amino acids. (*See generally, Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989), Ch. 7, incorporated by reference in its entirety for all purposes).

The variable regions of each light/heavy chain pair form the antibody binding site. Thus, an intact antibody has two binding sites. Except in bifunctional or bispecific antibodies, the two binding sites are the same. The chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions (FR) joined by three hypervariable regions, also called complementarity determining regions or CDRs. Naturally-occurring chains or recombinantly produced chains can be expressed with a leader sequence which is removed during cellular processing to produce a mature chain. Mature chains can also be recombinantly produced having a non-naturally occurring leader sequence, for example, to enhance secretion or alter the processing of a particular chain of interest.

The CDRs of the two mature chains of each pair are aligned by the framework regions, enabling binding to a specific epitope. From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. "FR4" also is referred to in the art as the D/J region of the variable heavy chain and the J region of the variable light chain. The assignment of

amino acids to each domain is in accordance with the definitions of Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991). An alternative structural definition has been proposed by Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); *Nature* 342:878 (1989); and *J. Mol. Biol.* 186:651 (1989) (hereinafter collectively referred to as "Chothia *et al.*" and incorporated by reference in their entirety for all purposes).

A. Aβ Antibodies

Therapeutic agents of the invention include antibodies that specifically bind to Aβ or other component of amyloid plaques. Such antibodies can be monoclonal or polyclonal. Some such antibodies bind specifically to the aggregated form of Aβ without binding to the soluble form. Some bind specifically to the soluble form without binding to the aggregated form. Some bind to both aggregated and soluble forms. Some such antibodies bind to a naturally occurring short form of Aβ (*i.e.*, Aβ39, 40 or 41) without binding to a naturally occurring long form of Aβ (*i.e.*, Aβ42 and Aβ43). Some antibodies bind to a long form of Aβ without binding to a short form. Some antibodies bind to Aβ without binding to full-length amyloid precursor protein. Antibodies used in therapeutic methods preferably have an intact constant region or at least sufficient of the constant region to interact with an Fc receptor. Human isotype IgG1 is preferred because of it having highest affinity of human isotypes for the FcRI receptor on phagocytic cells. Bispecific Fab fragments can also be used, in which one arm of the antibody has specificity for Aβ, and the other for an Fc receptor. Preferred antibodies bind to Aβ with a binding affinity greater than (or equal to) about 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, or 10^{10} M^{-1} (including affinities intermediate of these values).

Polyclonal sera typically contain mixed populations of antibodies binding to several epitopes along the length of Aβ. However, polyclonal sera can be specific to a particular segment of Aβ, such as Aβ1-10. Monoclonal antibodies bind to a specific epitope within Aβ that can be a conformational or nonconformational epitope. Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies can be tested using the transgenic animal model procedures described in the Examples. Preferred monoclonal antibodies bind to an epitope within residues 1-10 of Aβ (with the first N terminal residue of

natural Aβ designated 1). Some preferred monoclonal antibodies bind to an epitope within amino acids 1-5, and some to an epitope within 5-10. Some preferred antibodies bind to epitopes within amino acids 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 or 3-7. Some preferred antibodies bind to an epitope starting at resides 1-3 and ending at residues 7-11 of Aβ. Less preferred antibodies include those binding to epitopes with residues 10-15, 15-20, 25-30, 10-20, 20, 30, or 10-25 of Aβ. It is recommended that such antibodies be screened for activity in the mouse models described in the Examples before use. For example, it has been found that certain antibodies to epitopes within residues 10-18, 16-24, 18-21 and 33-42 lack activity (*e.g.*, lack the ability to reduce plaque burden and/or resolve the neuritic pathology associated with Alzheimer's disease). In some methods, multiple monoclonal antibodies having binding specificities to different epitopes are used. Such antibodies can be administered sequentially or simultaneously. Antibodies to amyloid components other than Aβ can also be used (*e.g.*, administered or co-administered). For example, antibodies can be directed to the amyloid associated protein synuclein.

When an antibody is said to bind to an epitope within specified residues, such as Aβ 1-5 for example, what is meant is that the antibody specifically binds to a polypeptide containing the specified residues (*i.e.*, Aβ 1-5 in this an example). Such an antibody does not necessarily contact every residue within Aβ 1-5. Nor does every single amino acid substitution or deletion with in Aβ1-5 necessarily significantly affect binding affinity. Epitope specificity of an antibody can be determined, for example, by forming a phage display library in which different members display different subsequences of Aβ. The phage display library is then selected for members specifically binding to an antibody under test. A family of sequences is isolated. Typically, such a family contains a common core sequence, and varying lengths of flanking sequences in different members. The shortest core sequence showing specific binding to the antibody defines the epitope bound by the antibody. Antibodies can also be tested for epitope specificity in a competition assay with an antibody whose epitope specificity has already been determined. For example, antibodies that compete with the 3D6 antibody for binding to Aβ bind to the same or similar epitope as 3D6, *i.e.*, within residues Aβ 1-5. Likewise antibodies that compete with the 10D5 antibody bind to the same or similar epitope, *i.e.*, within residues Aβ 3-7. Screening antibodies for epitope specificity is a

useful predictor of therapeutic efficacy. For example, an antibody determined to bind to an epitope within residues 1-7 of Aβ is likely to be effective in preventing and treating Alzheimer's disease according to the methodologies of the present invention.

Monoclonal or polyclonal antibodies that specifically bind to a preferred segment of Aβ without binding to other regions of Aβ have a number of advantages relative to monoclonal antibodies binding to other regions or polyclonal sera to intact Aβ. First, for equal mass dosages, dosages of antibodies that specifically bind to preferred segments contain a higher molar dosage of antibodies effective in clearing amyloid plaques. Second, antibodies specifically binding to preferred segments can induce a clearing response against amyloid deposits without inducing a clearing response against intact APP polypeptide, thereby reducing the potential side effects.

1. Production of Nonhuman Antibodies

The present invention features non-human antibodies, for example, antibodies having specificity for the preferred Aβ epitopes of the invention. Such antibodies can be used in formulating various therapeutic compositions of the invention or, preferably, provide complementarity determining regions for the production of humanized or chimeric antibodies (described in detail below). The production of non-human monoclonal antibodies, *e.g.*, murine, guinea pig, primate, rabbit or rat, can be accomplished by, for example, immunizing the animal with Aβ. A longer polypeptide comprising Aβ or an immunogenic fragment of Aβ or anti-idiotypic antibodies to an antibody to Aβ can also be used. See Harlow & Lane, *supra*, incorporated by reference for all purposes). Such an immunogen can be obtained from a natural source, by peptide synthesis or by recombinant expression. Optionally, the immunogen can be administered fused or otherwise complexed with a carrier protein, as described below. Optionally, the immunogen can be administered with an adjuvant. The term "adjuvant" refers to a compound that when administered in conjunction with an antigen augments the immune response to the antigen, but when administered alone does not generate an immune response to the antigen. Adjuvants can augment an immune response by several mechanisms including lymphocyte recruitment, stimulation of B and/or T cells, and stimulation of macrophages. Several types of adjuvant can be used as described

below. Complete Freund's adjuvant followed by incomplete adjuvant is preferred for immunization of laboratory animals.

Rabbits or guinea pigs are typically used for making polyclonal antibodies. Exemplary preparation of polyclonal antibodies, *e.g.*, for passive protection, can be performed as follows. 125 non-transgenic mice are immunized with 100 μg Aβ1-42, plus CFA/IFA adjuvant, and euthanized at 4-5 months. Blood is collected from immunized mice. IgG is separated from other blood components. Antibody specific for the immunogen may be partially purified by affinity chromatography. An average of about 0.5-1 mg of immunogen-specific antibody is obtained per mouse, giving a total of 60-120 mg.

Mice are typically used for making monoclonal antibodies. Monoclonals can be prepared against a fragment by injecting the fragment or longer form of Aβ into a mouse, preparing hybridomas and screening the hybridomas for an antibody that specifically binds to Aβ. Optionally, antibodies are screened for binding to a specific region or desired fragment of Aβ without binding to other nonoverlapping fragments of Aβ. The latter screening can be accomplished by determining binding of an antibody to a collection of deletion mutants of an Aβ peptide and determining which deletion mutants bind to the antibody. Binding can be assessed, for example, by Western blot or ELISA. The smallest fragment to show specific binding to the antibody defines the epitope of the antibody. Alternatively, epitope specificity can be determined by a competition assay is which a test and reference antibody compete for binding to Aβ. If the test and reference antibodies compete, then they bind to the same epitope or epitopes sufficiently proximal such that binding of one antibody interferes with binding of the other. The preferred isotype for such antibodies is mouse isotype IgG2a or equivalent isotype in other species. Mouse isotype IgG2a is the equivalent of human isotype IgG1.

2. Chimeric and Humanized Antibodies

The present invention also features chimeric and/or humanized antibodies (*i.e.*, chimeric and/or humanized immunoglobulins) specific for beta amyloid peptide. Chimeric and/or humanized antibodies have the same or similar binding specificity and affinity as a mouse or other nonhuman antibody that provides the starting material for construction of a chimeric or humanized antibody.

A. Production of Chimeric Antibodies

The term "chimeric antibody" refers to an antibody whose light and heavy chain genes have been constructed, typically by genetic engineering, from immunoglobulin gene segments belonging to different species. For example, the variable (V) segments of the genes from a mouse monoclonal antibody may be joined to human constant (C) segments, such as IgG1 and IgG4. Human isotype IgG1 is preferred. A typical chimeric antibody is thus a hybrid protein consisting of the V or antigen-binding domain from a mouse antibody and the C or effector domain from a human antibody.

B. Production of Humanized Antibodies

The term "humanized antibody" refers to an antibody comprising at least one chain comprising variable region framework residues substantially from a human antibody chain (referred to as the acceptor immunoglobulin or antibody) and at least one complementarity determining region substantially from a mouse-antibody, (referred to as the donor immunoglobulin or antibody). See, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989), US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,762, Selick *et al.*, WO 90/07861, and Winter, US 5,225,539 (incorporated by reference in their entirety for all purposes). The constant region(s), if present, are also substantially or entirely from a human immunoglobulin.

The substitution of mouse CDRs into a human variable domain framework is most likely to result in retention of their correct spatial orientation if the human variable domain framework adopts the same or similar conformation to the mouse variable framework from which the CDRs originated. This is achieved by obtaining the human variable domains from human antibodies whose framework sequences exhibit a high degree of sequence identity with the murine variable framework domains from which the CDRs were derived. The heavy and light chain variable framework regions can be derived from the same or different human antibody sequences. The human antibody sequences can be the sequences of naturally occurring human antibodies or can be consensus sequences of several human antibodies. See

Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger *et al.*, *Protein Engineering* 6:971 (1993) and Carter *et al.*, WO 92/22653.

Having identified the complementarity determining regions of the murine donor immunoglobulin and appropriate human acceptor immunoglobulins, the next step is to determine which, if any, residues from these components should be substituted to optimize the properties of the resulting humanized antibody. In general, substitution of human amino acid residues with murine should be minimized, because introduction of murine residues increases the risk of the antibody eliciting a human-anti-mouse-antibody (HAMA) response in humans. Art-recognized methods of determining immune response can be performed to monitor a HAMA response in a particular patient or during clinical trials. Patients administered humanized antibodies can be given an immunogenicity assessment at the beginning and throughout the administration of said therapy. The HAMA response is measured, for example, by detecting antibodies to the humanized therapeutic reagent, in serum samples from the patient using a method known to one in the art, including surface plasmon resonance technology (BIACORE) and/or solid-phase ELISA analysis.

Certain amino acids from the human variable region framework residues are selected for substitution based on their possible influence on CDR conformation and/or binding to antigen. The unnatural juxtaposition of murine CDR regions with human variable framework region can result in unnatural conformational restraints, which, unless corrected by substitution of certain amino acid residues, lead to loss of binding affinity.

The selection of amino acid residues for substitution is determined, in part, by computer modeling. Computer hardware and software are described herein for producing three-dimensional images of immunoglobulin molecules. In general, molecular models are produced starting from solved structures for immunoglobulin chains or domains thereof. The chains to be modeled are compared for amino acid sequence similarity with chains or domains of solved three-dimensional structures, and the chains or domains showing the greatest sequence similarity is/are selected as starting points for construction of the molecular model. Chains or domains sharing at least 50% sequence identity are selected for modeling, and preferably those sharing at least 60%, 70%, 80%, 90% sequence identity or more are selected for modeling. The solved

starting structures are modified to allow for differences between the actual amino acids in the immunoglobulin chains or domains being modeled, and those in the starting structure. The modified structures are then assembled into a composite immunoglobulin. Finally, the model is refined by energy minimization and by verifying that all atoms are within appropriate distances from one another and that bond lengths and angles are within chemically acceptable limits.

The selection of amino acid residues for substitution can also be determined, in part, by examination of the characteristics of the amino acids at particular locations, or empirical observation of the effects of substitution or mutagenesis of particular amino acids. For example, when an amino acid differs between a murine variable region framework residue and a selected human variable region framework residue, the human framework amino acid should usually be substituted by the equivalent framework amino acid from the mouse antibody when it is reasonably expected that the amino acid:

(1) noncovalently binds antigen directly,

(2) is adjacent to a CDR region,

(3) otherwise interacts with a CDR region (*e.g.*, is within about 3-6 Å of a CDR region as determined by computer modeling), or

(4) participates in the VL-VH interface.

Residues which "noncovalently bind antigen directly" include amino acids in positions in framework regions which are have a good probability of directly interacting with amino acids on the antigen according to established chemical forces, for example, by hydrogen bonding, Van der Waals forces, hydrophobic interactions, and the like.

CDR and framework regions are as defined by Kabat *et al.* or Chothia *et al.*, *supra*. When framework residues, as defined by Kabat *et al.*, *supra*, constitute structural loop residues as defined by Chothia *et al.*, *supra*, the amino acids present in the mouse antibody may be selected for substitution into the humanized antibody. Residues which are "adjacent to a CDR region" include amino acid residues in positions immediately adjacent to one or more of the CDRs in the primary sequence of the humanized immunoglobulin chain, for example, in positions immediately adjacent to a CDR as defined by Kabat, or a CDR as defined by Chothia (See *e.g.*, Chothia and Lesk

JMB 196:901 (1987)). These amino acids are particularly likely to interact with the amino acids in the CDRs and, if chosen from the acceptor, to distort the donor CDRs and reduce affinity. Moreover, the adjacent amino acids may interact directly with the antigen (Amit *et al.*, Science, 233:747 (1986), which is incorporated herein by reference) and selecting these amino acids from the donor may be desirable to keep all the antigen contacts that provide affinity in the original antibody.

Residues that "otherwise interact with a CDR region" include those that are determined by secondary structural analysis to be in a spatial orientation sufficient to effect a CDR region. In one embodiment, residues that "otherwise interact with a CDR region" are identified by analyzing a three-dimensional model of the donor immunoglobulin (*e.g.*, a computer-generated model). A three-dimensional model, typically of the original donor antibody, shows that certain amino acids outside of the CDRs are close to the CDRs and have a good probability of interacting with amino acids in the CDRs by hydrogen bonding, Van der Waals forces, hydrophobic interactions, etc. At those amino acid positions, the donor immunoglobulin amino acid rather than the acceptor immunoglobulin amino acid may be selected. Amino acids according to this criterion will generally have a side chain atom within about 3 angstrom units (Å) of some atom in the CDRs and must contain an atom that could interact with the CDR atoms according to established chemical forces, such as those listed above.

In the case of atoms that may form a hydrogen bond, the 3 Å is measured between their nuclei, but for atoms that do not form a bond, the 3 Å is measured between their Van der Waals surfaces. Hence, in the latter case, the nuclei must be within about 6 Å (3 Å plus the sum of the Van der Waals radii) for the atoms to be considered capable of interacting. In many cases the nuclei will be from 4 or 5 to 6 Å apart. In determining whether an amino acid can interact with the CDRs, it is preferred not to consider the last 8 amino acids of heavy chain CDR 2 as part of the CDRs, because from the viewpoint of structure, these 8 amino acids behave more as part of the framework.

Amino acids that are capable of interacting with amino acids in the CDRs, may be identified in yet another way. The solvent accessible surface area of each framework amino acid is calculated in two ways: (1) in the intact antibody, and (2) in a hypothetical molecule consisting of the antibody with its CDRs removed. A significant difference between these numbers of about 10 square angstroms or more shows that

access of the framework amino acid to solvent is at least partly blocked by the CDRs, and therefore that the amino acid is making contact with the CDRs. Solvent accessible surface area of an amino acid may be calculated based on a three-dimensional model of an antibody, using algorithms known in the art (*e.g.*, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) and Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971), both of which are incorporated herein by reference). Framework amino acids may also occasionally interact with the CDRs indirectly, by affecting the conformation of another framework amino acid that in turn contacts the CDRs.

The amino acids at several positions in the framework are known to be capable of interacting with the CDRs in many antibodies (Chothia and Lesk, *supra*, Chothia *et al.*, *supra* and Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175 (1990), all of which are incorporated herein by reference). Notably, the amino acids at positions 2, 48, 64 and 71 of the light chain and 26-30, 71 and 94 of the heavy chain (numbering according to Kabat) are known to be capable of interacting with the CDRs in many antibodies. The amino acids at positions 35 in the light chain and 93 and 103 in the heavy chain are also likely to interact with the CDRs. At all these numbered positions, choice of the donor amino acid rather than the acceptor amino acid (when they differ) to be in the humanized immunoglobulin is preferred. On the other hand, certain residues capable of interacting with the CDR region, such as the first 5 amino acids of the light chain, may sometimes be chosen from the acceptor immunoglobulin without loss of affinity in the humanized immunoglobulin.

Residues which "participate in the VL-VH interface" or "packing residues" include those residues at the interface between VL and VH as defined, for example, by Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) or Chothia *et al*, *supra*. Generally, unusual packing residues should be retained in the humanized antibody if they differ from those in the human frameworks.

In general, one or more of the amino acids fulfilling the above criteria is substituted. In some embodiments, all or most of the amino acids fulfilling the above criteria are substituted. Occasionally, there is some ambiguity about whether a particular amino acid meets the above criteria, and alternative variant immunoglobulins are produced, one of which has that particular substitution, the other of which does not.

Alternative variant immunoglobulins so produced can be tested in any of the assays described herein for the desired activity, and the preferred immunoglobulin selected.

Usually the CDR regions in humanized antibodies are substantially identical, and more usually, identical to the corresponding CDR regions of the donor antibody. Although not usually desirable, it is sometimes possible to make one or more conservative amino acid substitutions of CDR residues without appreciably affecting the binding affinity of the resulting humanized immunoglobulin. By conservative substitutions is intended combinations such as gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; and phe, tyr.

Additional candidates for substitution are acceptor human framework amino acids that are unusual or "rare" for a human immunoglobulin at that position. These amino acids can be substituted with amino acids from the equivalent position of the mouse donor antibody or from the equivalent positions of more typical human immunoglobulins. For example, substitution may be desirable when the amino acid in a human framework region of the acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or when the amino acid in the acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is also rare, relative to other human sequences. These criterion help ensure that an atypical amino acid in the human framework does not disrupt the antibody structure. Moreover, by replacing an unusual human acceptor amino acid with an amino acid from the donor antibody that happens to be typical for human antibodies, the humanized antibody may be made less immunogenic.

The term "rare", as used herein, indicates an amino acid occurring at that position in less than about 20% but usually less than about 10% of sequences in a representative sample of sequences, and the term "common", as used herein, indicates an amino acid occurring in more than about 25% but usually more than about 50% of sequences in a representative sample. For example, all human light and heavy chain variable region sequences are respectively grouped into "subgroups" of sequences that are especially homologous to each other and have the same amino acids at certain critical positions (Kabat *et al., supra*). When deciding whether an amino acid in a human acceptor sequence is "rare" or "common" among human sequences, it will often

be preferable to consider only those human sequences in the same subgroup as the acceptor sequence.

Additional candidates for substitution are acceptor human framework amino acids that would be identified as part of a CDR region under the alternative definition proposed by Chothia *et al.*, *supra*. Additional candidates for substitution are acceptor human framework amino acids that would be identified as part of a CDR region under the AbM and/or contact definitions. Notably, CDR1 in the variable heavy chain is defined as including residues 26-32.

Additional candidates for substitution are acceptor framework residues that correspond to a rare or unusual donor framework residue. Rare or unusual donor framework residues are those that are rare or unusual (as defined herein) for murine antibodies at that position. For murine antibodies, the subgroup can be determined according to Kabat and residue positions identified which differ from the consensus. These donor specific differences may point to somatic mutations in the murine sequence which enhance activity. Unusual residues that are predicted to affect binding are retained, whereas residues predicted to be unimportant for binding can be substituted.

Additional candidates for substitution are non-germline residues occuring in an acceptor framework region. For example, when an acceptor antibody chain (*i.e.*, a human antibody chain sharing significant sequence identity with the donor antibody chain) is aligned to a germline antibody chain (likewise sharing significant sequence identity with the donor chain), residues not matching between acceptor chain framework and the germline chain framework can be substituted with corresponding residues from the germline sequence.

Other than the specific amino acid substitutions discussed above, the framework regions of humanized immunoglobulins are usually substantially identical, and more usually, identical to the framework regions of the human antibodies from which they were derived. Of course, many of the amino acids in the framework region make little or no direct contribution to the specificity or affinity of an antibody. Thus, many individual conservative substitutions of framework residues can be tolerated without appreciable change of the specificity or affinity of the resulting humanized immunoglobulin. Thus, in one embodiment the variable framework region of the humanized immunoglobulin shares at least 85% sequence identity to a human variable

framework region sequence or consensus of such sequences. In another embodiment, the variable framework region of the humanized immunoglobulin shares at least 90%, preferably 95%, more preferably 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to a human variable framework region sequence or consensus of such sequences. In general, however, such substitutions are undesirable.

The humanized antibodies preferably exhibit a specific binding affinity for antigen of at least 10^7, 10^8, 10^9 or 10^{10} M^{-1}. Usually the upper limit of binding affinity of the humanized antibodies for antigen is within a factor of three, four or five of that of the donor immunoglobulin. Often the lower limit of binding affinity is also within a factor of three, four or five of that of donor immunoglobulin. Alternatively, the binding affinity can be compared to that of a humanized antibody having no substitutions (*e.g.*, an antibody having donor CDRs and acceptor FRs, but no FR substitutions). In such instances, the binding of the optimized antibody (with substitutions) is preferably at least two- to three-fold greater, or three- to four-fold greater, than that of the unsubstituted antibody. For making comparisons, activity of the various antibodies can be determined, for example, by BIACORE (*i.e.*, surface plasmon resonance using unlabelled reagents) or competitive binding assays.

C. Production of Humanized 3D6 Antibodies

A preferred embodiment of the present invention features a humanized antibody to the N-terminus of Aβ, in particular, for use in the therapeutic and/or diagnostic methodologies described herein. A particularly preferred starting material for production of humanized antibodies is 3D6. 3D6 is specific for the N-terminus of Aβ and has been shown to mediate phagocytosis (*e.g.*, induce phagocytosis) of amyloid plaque (see Examples I-V). The cloning and sequencing of cDNA encoding the 3D6 antibody heavy and light chain variable regions is described in Example VI.

Suitable human acceptor antibody sequences are identified by computer comparisons of the amino acid sequences of the mouse variable regions with the sequences of known human antibodies. The comparison is performed separately for heavy and light chains but the principles are similar for each. In particular, variable domains from human antibodies whose framework sequences exhibit a high degree of sequence identity with the murine VL and VH framework regions were identified by

query of the Kabat Database using NCBI BLAST (publicly accessible through the National Institutes of Health NCBI internet server) with the respective murine framework sequences. In one embodiment, acceptor sequences sharing greater that 50% sequence identity with murine donor sequences are selected. Preferably, acceptor antibody sequences sharing 60%, 70%, 80%, 90% or more are selected.

A computer comparison of 3D6 revealed that the 3D6 light chain shows the greatest sequence identity to human light chains of subtype kappa II, and that the 3D6 heavy chain shows greatest sequence identity to human heavy chains of subtype III, as defined by Kabat *et al.*, *supra*. Thus, light and heavy human framework regions are preferably derived from human antibodies of these subtypes, or from consensus sequences of such subtypes. The preferred light chain human variable regions showing greatest sequence identity to the corresponding region from 3D6 are from antibodies having Kabat ID Numbers 019230, 005131, 005058, 005057, 005059, U21040 and U41645, with 019230 being more preferred. The preferred heavy chain human variable regions showing greatest sequence identity to the corresponding region from 3D6 are from antibodies having Kabat ID Numbers 045919, 000459, 000553, 000386 and M23691, with 045919 being more preferred.

Residues are next selected for substitution, as follows. When an amino acid differs between a 3D6 variable framework region and an equivalent human variable framework region, the human framework amino acid should usually be substituted by the equivalent mouse amino acid if it is reasonably expected that the amino acid:

(1) noncovalently binds antigen directly,

(2) is adjacent to a CDR region, is part of a CDR region under the alternative definition proposed by Chothia *et al.*, *supra*, or otherwise interacts with a CDR region (*e.g.*, is within about 3A of a CDR region) (*e.g.*, amino acids at positions L2, H49 and H94 of 3D6), or

(3) participates in the VL-VH interface (*e.g.*, amino acids at positions L36, L46 and H93 of 3D6).

Computer modeling of the 3D6 antibody heavy and light chain variable regions, and humanization of the 3D6 antibody is described in Example VII. Briefly, a three-dimensional model was generated based on the closest solved murine antibody structures for the heavy and light chains. For this purpose, an antibody designated 1CR9

(Protein Data Bank (PDB) ID: 1CR9, Kanyo *et al., J. Mol. Biol.* 293:855 (1999)) was chosen as a template for modeling the 3D6 light chain, and an antibody designated 1OPG (PDB ID: 1OPG, Kodandapani *et al., J. Biol. Chem.* 270:2268 (1995)) was chosen as the template for modeling the heavy chain. The model was further refined by a series of energy minimization steps to relieve unfavorable atomic contacts and optimize electrostatic and van der Walls interactions. The solved structure of 1qkz (PDB ID: 1QKZ, Derrick *et al., J. Mol. Biol.* 293:81 (1999)) was chosen as a template for modeling CDR3 of the heavy chain as 3D6 and 1OPG did not exhibit significant sequence homology in this region when aligned for comparison purposes.

Three-dimensional structural information for the antibodies described herein is publicly available, for example, from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). The PDB is freely accessible *via* the World Wide Web internet and is described by Berman *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research*, 28:235. Computer modeling allows for the identification of CDR-interacting residues. The computer model of the structure of 3D6 can in turn serve as a starting point for predicting the three-dimensional structure of an antibody containing the 3D6 complementarity determining regions substituted in human framework structures. Additional models can be constructed representing the structure as further amino acid substitutions are introduced.

In general, substitution of one, most or all of the amino acids fulfilling the above criteria is desirable. Accordingly, the humanized antibodies of the present invention will usually contain a substitution of a human light chain framework residue with a corresponding 3D6 residue in at least 1, 2 or 3, and more usually 4, of the following positions: L1, L2, L36 and L46. The humanized antibodies also usually contain a substitution of a human heavy chain framework residue with a corresponding 3D6 residue in at least 1, 2, and sometimes 3, of the following positions: H49, H93 and H94. Humanized antibodies can also contain a substitution of a heavy chain framework residue with a corresponding germline residue in at least 1, 2, and sometimes 3, of the following positions: H74, H77 and H89.

Occasionally, however, there is some ambiguity about whether a particular amino acid meets the above criteria, and alternative variant immunoglobulins are produced, one of which has that particular substitution, the other of which does not.

In instances where substitution with a murine residue would introduce a residue that is rare in human immunoglobulins at a particular position, it may be desirable to test the antibody for activity with or without the particular substitution. If activity (*e.g.*, binding affinity and/or binding specificity) is about the same with or without the substitution, the antibody without substitution may be preferred, as it would be expected to elicit less of a HAHA response, as described herein.

Other candidates for substitution are acceptor human framework amino acids that are unusual for a human immunoglobulin at that position. These amino acids can be substituted with amino acids from the equivalent position of more typical human immunoglobulins. Alternatively, amino acids from equivalent positions in the mouse 3D6 can be introduced into the human framework regions when such amino acids are typical of human immunoglobulin at the equivalent positions.

In additional embodiments, when the human light chain framework acceptor immunoglobulin is Kabat ID Number 019230, the light chain contains substitutions in at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or more usually 13, of the following positions: L7, L10, L12, L15, L17, L39, L45, L63, L78, L83, L85, L100 or L104. In additional embodiments when the human heavy chain framework acceptor immunoglobulin is Kabat ID Number 045919, the heavy chain contains substitutions in at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, or more usually 15, of the following positions: H3, H5, H13, H16, H19, H40, H41, H42, H44, H72, H77, H82A, H83, H84, or H108. These positions are substituted with the amino acid from the equivalent position of a human immunoglobulin having a more typical amino acid residue. Examples of appropriate amino acids to substitute are shown in Figures 1 and 2.

Other candidates for substitution are non-germline residues occurring in a framework region. A computer comparison of 3D6 with known germline sequences revealed that heavy chains showing the greatest degree of sequence identity include germline variable region sequences VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 and VH3-11, with VH3-23 being more preferred. Alignment of Kabat ID 045919 with VH3-23 reveals that residues H74, H77 and/or H89 may be selected for substitution with corresponding germline residues (*e.g.*, residues H74, H77 and/or H89 when comparing Kabat ID 045919 and VH3-23). Likewise, germline sequences having the greatest degree of identity to the 3D6 light chain include A1, A17, A18, A2 and A19, with A19

being most preferred. Residues not matching between a selected light chain acceptor framework and one of these germline sequences could be selected for substitution with the corresponding germline residue.

Table 1 summarizes the sequence analysis of the 3D6 VH and VL regions. Additional mouse and human structures that can be used for computer modeling of the 3D6 antibody and additional human antibodies are set forth as well as germline sequences that can be used in selecting amino acid substitutions. Rare mouse residues are also set forth in Table 1. Rare mouse residues are identified by comparing the donor VL and/or VH sequences with the sequences of other members of the subgroup to which the donor VL and/or VH sequences belong (according to Kabat) and identifying the residue positions which differ from the consensus. These donor specific differences may point to somatic mutations which enhance activity. Unusual or rare residues close to the binding site may possibly contact the antigen, making it desirable to retain the mouse residue. However, if the unusual mouse residue is not important for binding, use of the corresponding acceptor residue is preferred as the mouse residue may create immunogenic neoepitopes in the humanized antibody. In the situation where an unusual residue in the donor sequence is actually a common residues in the corresponding acceptor sequence, the preferred residue is clearly the acceptor residue.

Table 1: Summary of 3D6 V-region sequence

Chain	Heavy	Light
Mouse subgroup (Kabat seq ID#)	IIID (002688)	II (005840-005844, 005851-005853, 005857, 005863)
Mouse homologs (Kabat/Genbank)	002727/163.1'CL 002711/H35-C6'CL 002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL 002715/ASWA2'CL 020669/#14'CL	005840/1210.7 005843/42.4b.12.2'CL 005842/BXW-14'CL 005841/42.7B3.2'CL 005851/36-60CRI-
Rare amino acids (% frequency of occurrence in class)	N40 (0.233%) D42 (0.699%)	Y1(.035%) I15 (3.3%) D27 (0.867%)-CDR1 I78 (0.677%) L85 (0.625%) W89 (0.815%)-CDR3

		K106A (0.295%)
Human Subgroup	III (000488-000491, 000503, 000624)	II (005046)
Chothia canonical CDR groupings [pdb example]	H1: class 1 [2fbj] H2: class 3 [1igc]	L1: class 4 [1rmf] L2: class1 [1lmk] L3: class 1 [1tet]
Closest solved mouse structures	PDB ID: 1OPG Kodandapani *et al.*, *supra*; (72% 2Å)	PDB ID: 1CR9; Kanyo *et al.*, *supra*; (94%, 2Å) PDB ID: 1NLD; Davies *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog.* 53:186 (1997); (98%, 2.8Å)
Closest solved human structures	1VH (68%, nmr) 443560 (65%, IgG, λ myeloma, 1.8Å) KOL/2FB4H (60%, myeloma, 3Å)	1LVE (57%, LEN) 1B6DA (54%, B-J dimer, 2.8Å); 1VGEL (54%, autoAb)
Germline query (Hu) results (top 4)	VH3-48 (4512283/BAA75032.1) VH3-23 (4512287/BAA75046.1) VH3-7 (4512300/BAA75056.1) VH3-21 (4512287/BAA75047.1) VH3-11 (4152300/BAA75053.1)	A1(x63402) A17 (x63403) A18 (X63396) A2 (m31952) A19 (x63397)

*heavy chain and light chain from the same antibody (O-81, Hirabayashi *et al.* NAR 20:2601).

Kabat ID sequences referenced herein are publicly available, for example, from the Northwestern University Biomedical Engineering Department's Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest. Three-dimensional structural information for antibodies described herein is publicly available, for example, from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). The PDB is freely accessible *via* the World Wide Web internet and is described by Berman *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research*, p235-242. Germline gene sequences referenced herein are publicly available, for example, from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database of sequences in collections of Igh, Ig kappa and Ig lambda germline V genes (as a division of the National Library of Medicine (NLM) at the National Institutes of Health (NIH)). Homology searching of the NCBI "Ig Germline Genes" database is provided by IgG BLAST™.

In a preferred embodiment, a humanized antibody of the present invention contains (i) a light chain comprising a variable domain comprising murine 3D6 VL CDRs and a human acceptor framework, the framework having at least one, preferably two, three or four residues selected from the group consisting of L1, L2, L36, and L46 substituted with the corresponding 3D6 residue and (ii) a heavy chain comprising 3D6 VH CDRs and a human acceptor framework, the framework having at least one, preferably two or three residues selected from the group consisting of H49, H93 and H94 substituted with the corresponding 3D6 residue, and, optionally, at least one, preferably two or three residues selected from the group consisting of H74, H77 and H89 is substituted with a corresponding human germline residue..

In a more preferred embodiment, a humanized antibody of the present invention contains (i) a light chain comprising a variable domain comprising murine 3D6 VL CDRs and a human acceptor framework, the framework having residue 1 substituted with a tyr (Y), residue 2 substituted with a val (V), residue 36 substituted with a leu (L) and/or residue 46 substituted with an arg (R), and (ii) a heavy chain comprising 3D6 VH CDRs and a human acceptor framework, the framework having residue 49 substituted with an ala (A), residue 93 substituted with a val (V) and/or residue 94 substituted with an arg (R), and, optionally, having residue 74 substituted with a ser (S), residue 77 substituted with a thr (T) and/or residue 89 substituted with a val (V).

In a particularly preferred embodiment, a humanized antibody of the present invention has structural features, as described herein, and further has at least one (preferably two, three, four or all) of the following activities: (1) binds aggregated Aβ1-42 (*e.g.*, as determined by ELISA); (2) binds Aβ in plaques (*e.g.*, staining of AD and/or PDAPP plaques); (3) binds Aβ with two- to three- fold higher binding affinity as compared to chimeric 3D6 (*e.g.*, 3D6 having murine CDRs and human acceptor FRs); (4) mediates phagocytosis of Aβ (*e.g.*, in an *ex vivo* phagocytosis assay, as described herein); and (5) crosses the blood-brain barrier (*e.g.*, demonstrates short-term brain localization, for example, in a PDAPP animal model, as described herein).

In another embodiment, a humanized antibody of the present invention has structural features, as described herein, binds Aβ in a manner or with an affinity sufficient to elicit at least one of the following *in vivo* effects: (1) reduce Aβ plaque

burden; (2) prevent plaque formation; (3) reduce levels of soluble Aβ; (4) reduce the neuritic pathology associated with an amyloidogenic disorder; (5) lessens or ameliorate at least one physiological symptom associated with an amyloidogenic disorder; and/or (6) improves cognitive function.

In another embodiment, a humanized antibody of the present invention has structural features, as described herein, and specifically binds to an epitope comprising residues 1-5 or 3-7 of Aβ.

3. Human Antibodies

Human antibodies against Aβ are provided by a variety of techniques described below. Some human antibodies are selected by competitive binding experiments, or otherwise, to have the same epitope specificity as a particular mouse antibody, such as one of the mouse monoclonals described herein. Human antibodies can also be screened for a particular epitope specificity by using only a fragment of Aβ as the immunogen, and/or by screening antibodies against a collection of deletion mutants of Aβ. Human antibodies preferably have human IgG1 isotype specificity.

a. Trioma Methodology

The basic approach and an exemplary cell fusion partner, SPAZ-4, for use in this approach have been described by Oestberg *et al.*, Hybridoma 2:361 (1983); Oestberg, US Patent No. 4,634,664; and Engleman *et al.*, US Patent 4,634,666 (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). The antibody-producing cell lines obtained by this method are called triomas, because they are descended from three cells; two human and one mouse. Initially, a mouse myeloma line is fused with a human B-lymphocyte to obtain a non-antibody-producing xenogeneic hybrid cell, such as the SPAZ-4 cell line described by Oestberg, *supra*. The xenogeneic cell is then fused with an immunized human B-lymphocyte to obtain an antibody-producing trioma cell line. Triomas have been found to produce antibody more stably than ordinary hybridomas made from human cells.

The immunized B-lymphocytes are obtained from the blood, spleen, lymph nodes or bone marrow of a human donor. If antibodies against a specific antigen or epitope are desired, it is preferable to use that antigen or epitope thereof for immunization. Immunization can be either *in vivo* or *in vitro*. For *in vivo* immunization,

B cells are typically isolated from a human immunized with Aβ, a fragment thereof, larger polypeptide containing Aβ or fragment, or an anti-idiotypic antibody to an antibody to Aβ. In some methods, B cells are isolated from the same patient who is ultimately to be administered antibody therapy. For *in vitro* immunization, B-lymphocytes are typically exposed to antigen for a period of 7-14 days in a media such as RPMI-1640 (see Engleman, *supra*) supplemented with 10% human plasma.

The immunized B-lymphocytes are fused to a xenogeneic hybrid cell such as SPAZ-4 by well-known methods. For example, the cells are treated with 40-50% polyethylene glycol of MW 1000-4000, at about 37 degrees C, for about 5-10 min. Cells are separated from the fusion mixture and propagated in media selective for the desired hybrids (*e.g.*, HAT or AH). Clones secreting antibodies having the required binding specificity are identified by assaying the trioma culture medium for the ability to bind to Aβ or a fragment thereof. Triomas producing human antibodies having the desired specificity are subcloned by the limiting dilution technique and grown *in vitro* in culture medium. The trioma cell lines obtained are then tested for the ability to bind Aβ or a fragment thereof.

Although triomas are genetically stable they do not produce antibodies at very high levels. Expression levels can be increased by cloning antibody genes from the trioma into one or more expression vectors, and transforming the vector into standard mammalian, bacterial or yeast cell lines.

b. Transgenic Non-Human Mammals

Human antibodies against Aβ can also be produced from non-human transgenic mammals having transgenes encoding at least a segment of the human immunoglobulin locus. Usually, the endogenous immunoglobulin locus of such transgenic mammals is functionally inactivated. Preferably, the segment of the human immunoglobulin locus includes unrearranged sequences of heavy and light chain components. Both inactivation of endogenous immunoglobulin genes and introduction of exogenous immunoglobulin genes can be achieved by targeted homologous recombination, or by introduction of YAC chromosomes. The transgenic mammals resulting from this process are capable of functionally rearranging the immunoglobulin component sequences, and expressing a repertoire of antibodies of various isotypes

encoded by human immunoglobulin genes, without expressing endogenous immunoglobulin genes. The production and properties of mammals having these properties are described in detail by, *e.g.*, Lonberg *et al.*, WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148:1547 (1994), *Nature Biotechnology* 14:826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). Transgenic mice are particularly suitable. Anti-Aβ antibodies are obtained by immunizing a transgenic nonhuman mammal, such as described by Lonberg or Kucherlapati, *supra*, with Aβ or a fragment thereof. Monoclonal antibodies are prepared by, *e.g.*, fusing B-cells from such mammals to suitable myeloma cell lines using conventional Kohler-Milstein technology. Human polyclonal antibodies can also be provided in the form of serum from humans immunized with an immunogenic agent. Optionally, such polyclonal antibodies can be concentrated by affinity purification using Aβ or other amyloid peptide as an affinity reagent.

c. Phage Display Methods

A further approach for obtaining human anti-Aβ antibodies is to screen a DNA library from human B cells according to the general protocol outlined by Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989). As described for trioma methodology, such B cells can be obtained from a human immunized with Aβ, fragments, longer polypeptides containing Aβ or fragments or anti-idiotypic antibodies. Optionally, such B cells are obtained from a patient who is ultimately to receive antibody treatment. Antibodies binding to Aβ or a fragment thereof are selected. Sequences encoding such antibodies (or a binding fragments) are then cloned and amplified. The protocol described by Huse is rendered more efficient in combination with phage-display technology. See, *e.g.*, Dower *et al.*, WO 91/17271, McCafferty *et al.*, WO 92/01047, Herzig *et al.*, US 5,877,218, Winter *et al.*, US 5,871,907, Winter *et al.*, US 5,858,657, Holliger *et al.*, US 5,837,242, Johnson *et al.*, US 5,733,743 and Hoogenboom *et al.*, US 5,565,332 (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). In these methods, libraries of phage are produced in which members display different antibodies on their outer surfaces. Antibodies are usually displayed as Fv or Fab fragments. Phage

displaying antibodies with a desired specificity are selected by affinity enrichment to an Aβ peptide or fragment thereof.

In a variation of the phage-display method, human antibodies having the binding specificity of a selected murine antibody can be produced. See Winter, WO 92/20791. In this method, either the heavy or light chain variable region of the selected murine antibody is used as a starting material. If, for example, a light chain variable region is selected as the starting material, a phage library is constructed in which members display the same light chain variable region (*i.e.*, the murine starting material) and a different heavy chain variable region. The heavy chain variable regions are obtained from a library of rearranged human heavy chain variable regions. A phage showing strong specific binding for Aβ (*e.g.*, at least 10^8 and preferably at least 10^9 M^{-1}) is selected. The human heavy chain variable region from this phage then serves as a starting material for constructing a further phage library. In this library, each phage displays the same heavy chain variable region (*i.e.*, the region identified from the first display library) and a different light chain variable region. The light chain variable regions are obtained from a library of rearranged human variable light chain regions. Again, phage showing strong specific binding for Aβ are selected. These phage display the variable regions of completely human anti-Aβ antibodies. These antibodies usually have the same or similar epitope specificity as the murine starting material.

4. Production of Variable Regions

Having conceptually selected the CDR and framework components of humanized immunoglobulins, a variety of methods are available for producing such immunoglobulins. Because of the degeneracy of the code, a variety of nucleic acid sequences will encode each immunoglobulin amino acid sequence. The desired nucleic acid sequences can be produced by *de novo* solid-phase DNA synthesis or by PCR mutagenesis of an earlier prepared variant of the desired polynucleotide. Oligonucleotide-mediated mutagenesis is a preferred method for preparing substitution, deletion and insertion variants of target polypeptide DNA. See Adelman *et al.*, DNA 2:183 (1983). Briefly, the target polypeptide DNA is altered by hybridizing an oligonucleotide encoding the desired mutation to a single-stranded DNA template. After hybridization, a DNA polymerase is used to synthesize an entire second complementary

strand of the template that incorporates the oligonucleotide primer, and encodes the selected alteration in the target polypeptide DNA.

5. Selection of Constant Regions

The variable segments of antibodies produced as described *supra* (*e.g.*, the heavy and light chain variable regions of chimeric, humanized, or human antibodies) are typically linked to at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Human constant region DNA sequences can be isolated in accordance with well known procedures from a variety of human cells, but preferably immortalized B cells (see Kabat *et al.*, *supra*, and Liu *et al.*, W087/02671) (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). Ordinarily, the antibody will contain both light chain and heavy chain constant regions. The heavy chain constant region usually includes CH1, hinge, CH2, CH3, and CH4 regions. The antibodies described herein include antibodies having all types of constant regions, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. The choice of constant region depends, in part, whether antibody-dependent complement and/or cellular mediated toxicity is desired. For example, isotopes IgG1 and IgG3 have complement activity and isotypes IgG2 and IgG4 do not. When it is desired that the antibody (*e.g.*, humanized antibody) exhibit cytotoxic activity, the constant domain is usually a complement fixing constant domain and the class is typically IgG1. When such cytotoxic activity is not desirable, the constant domain may be of the IgG2 class. Choice of isotype can also affect passage of antibody into the brain. Human isotype IgG1 is preferred. Light chain constant regions can be lambda or kappa. The humanized antibody may comprise sequences from more than one class or isotype. Antibodies can be expressed as tetramers containing two light and two heavy chains, as separate heavy chains, light chains, as Fab, Fab' F(ab')2, and Fv, or as single chain antibodies in which heavy and light chain variable domains are linked through a spacer.

6. Expression of Recombinant Antibodies

Chimeric, humanized and human antibodies are typically produced by recombinant expression. Nucleic acids encoding humanized light and heavy chain variable regions, optionally linked to constant regions, are inserted into expression vectors. The light and heavy chains can be cloned in the same or different expression vectors. The DNA segments encoding immunoglobulin chains are operably linked to control sequences in the expression vector(s) that ensure the expression of immunoglobulin polypeptides. Expression control sequences include, but are not limited to, promoters (*e.g.*, naturally-associated or heterologous promoters), signal sequences, enhancer elements, and transcription termination sequences. Preferably, the expression control sequences are eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and the collection and purification of the crossreacting antibodies.

These expression vectors are typically replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors contain selection markers (*e.g.*, ampicillin-resistance, hygromycin-resistance, tetracycline resistance or neomycin resistance) to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences (see, *e.g.*, Itakura *et al.*, US Patent 4,704,362).

E. coli is one prokaryotic host particularly useful for cloning the polynucleotides (*e.g.*, DNA sequences) of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as *Bacillus subtilus*, and other enterobacteriaceae, such as *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which will typically contain expression control sequences compatible with the host cell (*e.g.*, an origin of replication). In addition, any number of a variety of well-known promoters will be present, such as the lactose promoter system, a tryptophan (trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phage lambda. The promoters will typically control expression, optionally with an operator sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation.

Other microbes, such as yeast, are also useful for expression. *Saccharomyces* is a preferred yeast host, with suitable vectors having expression control sequences (*e.g.*, promoters), an origin of replication, termination sequences and the like as desired. Typical promoters include 3-phosphoglycerate kinase and other glycolytic enzymes. Inducible yeast promoters include, among others, promoters from alcohol dehydrogenase, isocytochrome C, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

In addition to microorganisms, mammalian tissue cell culture may also be used to express and produce the polypeptides of the present invention (*e.g.*, polynucleotides encoding immunoglobulins or fragments thereof). See Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Eukaryotic cells are actually preferred, because a number of suitable host cell lines capable of secreting heterologous proteins (*e.g.*, intact immunoglobulins) have been developed in the art, and include CHO cell lines, various Cos cell lines, HeLa cells, preferably, myeloma cell lines, or transformed B-cells or hybridomas. Preferably, the cells are nonhuman. Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, and an enhancer (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from immunoglobulin genes, SV40, adenovirus, bovine papilloma virus, cytomegalovirus and the like. See Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Alternatively, antibody-coding sequences can be incorporated in transgenes for introduction into the genome of a transgenic animal and subsequent expression in the milk of the transgenic animal (see, *e.g.*, Deboer *et al.*, US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, and Meade *et al.*, US 5,849,992). Suitable transgenes include coding sequences for light and/or heavy chains in operable linkage with a promoter and enhancer from a mammary gland specific gene, such as casein or beta lactoglobulin.

The vectors containing the polynucleotide sequences of interest (*e.g.*, the heavy and light chain encoding sequences and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for

prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment, electroporation, lipofection, biolistics or viral-based transfection may be used for other cellular hosts. (See generally Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989) (incorporated by reference in its entirety for all purposes). Other methods used to transform mammalian cells include the use of polybrene, protoplast fusion, liposomes, electroporation, and microinjection (see generally, Sambrook *et al.*, *supra*). For production of transgenic animals, transgenes can be microinjected into fertilized oocytes, or can be incorporated into the genome of embryonic stem cells, and the nuclei of such cells transferred into enucleated oocytes.

When heavy and light chains are cloned on separate expression vectors, the vectors are co-transfected to obtain expression and assembly of intact immunoglobulins. Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, HPLC purification, gel electrophoresis and the like (see generally Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses.

7. Antibody Fragments

Also contemplated within the scope of the instant invention are antibody fragments. In one embodiment, fragments of non-human, chimeric and/or human antibodies are provided. In another embodiment, fragments of humanized antibodies are provided. Typically, these fragments exhibit specific binding to antigen with an affinity of at least 10^7, and more typically 10^8 or 10^9 M^{-1}. Humanized antibody fragments include separate heavy chains, light chains Fab, Fab' F(ab')2, Fabc, and Fv. Fragments are produced by recombinant DNA techniques, or by enzymatic or chemical separation of intact immunoglobulins.

8. Testing Antibodies for Therapeutic Efficacy in Animal Models

Groups of 7-9 month old PDAPP mice each are injected with 0.5 mg in PBS of polyclonal anti-Aβ or specific anti-Aβ monoclonal antibodies. All antibody preparations are purified to have low endotoxin levels. Monoclonals can be prepared against a fragment by injecting the fragment or longer form of Aβ into a mouse, preparing hybridomas and screening the hybridomas for an antibody that specifically binds to a desired fragment of Aβ without binding to other nonoverlapping fragments of Aβ.

Mice are injected intraperitoneally as needed over a 4 month period to maintain a circulating antibody concentration measured by ELISA titer of greater than 1/1000 defined by ELISA to Aβ42 or other immunogen. Titers are monitored and mice are euthanized at the end of 6 months of injections. Histochemistry, Aβ levels and toxicology are performed post mortem. Ten mice are used per group.

9. Screening Antibodies for Clearing Activity

The invention also provides methods of screening an antibody for activity in clearing an amyloid deposit or any other antigen, or associated biological entity, for which clearing activity is desired. To screen for activity against an amyloid deposit, a tissue sample from a brain of a patient with Alzheimer's disease or an animal model having characteristic Alzheimer's pathology is contacted with phagocytic cells bearing an Fc receptor, such as microglial cells, and the antibody under test in a medium *in vitro*. The phagocytic cells can be a primary culture or a cell line, such as BV-2, C8-B4, or THP-1. In some methods, the components are combined on a microscope slide to facilitate microscopic monitoring. In some methods, multiple reactions are performed in parallel in the wells of a microtiter dish. In such a format, a separate miniature microscope slide can be mounted in the separate wells, or a nonmicroscopic detection format, such as ELISA detection of Aβ can be used. Preferably, a series of measurements is made of the amount of amyloid deposit in the *in vitro* reaction mixture, starting from a baseline value before the reaction has proceeded, and one or more test values during the reaction. The antigen can be detected by staining, for example, with a fluorescently labeled antibody to Aβ or other component of amyloid plaques. The antibody used for staining may or may not be the same as the antibody being tested for

clearing activity. A reduction relative to baseline during the reaction of the amyloid deposits indicates that the antibody under test has clearing activity. Such antibodies are likely to be useful in preventing or treating Alzheimer's and other amyloidogenic diseases.

Analogous methods can be used to screen antibodies for activity in clearing other types of biological entities. The assay can be used to detect clearing activity against virtually any kind of biological entity. Typically, the biological entity has some role in human or animal disease. The biological entity can be provided as a tissue sample or in isolated form. If provided as a tissue sample, the tissue sample is preferably unfixed to allow ready access to components of the tissue sample and to avoid perturbing the conformation of the components incidental to fixing. Examples of tissue samples that can be tested in this assay include cancerous tissue, precancerous tissue, tissue containing benign growths such as warts or moles, tissue infected with pathogenic microorganisms, tissue infiltrated with inflammatory cells, tissue bearing pathological matrices between cells (*e.g.*, fibrinous pericarditis), tissue bearing aberrant antigens, and scar tissue. Examples of isolated biological entities that can be used include Aβ, viral antigens or viruses, proteoglycans, antigens of other pathogenic microorganisms, tumor antigens, and adhesion molecules. Such antigens can be obtained from natural sources, recombinant expression or chemical synthesis, among other means. The tissue sample or isolated biological entity is contacted with phagocytic cells bearing Fc receptors, such as monocytes or microglial cells, and an antibody to be tested in a medium. The antibody can be directed to the biological entity under test or to an antigen associated with the entity. In the latter situation, the object is to test whether the biological entity is vicariously phagocytosed with the antigen. Usually, although not necessarily, the antibody and biological entity (sometimes with an associated antigen), are contacted with each other before adding the phagocytic cells. The concentration of the biological entity and/or the associated antigen remaining in the medium, if present, is then monitored. A reduction in the amount or concentration of antigen or the associated biological entity in the medium indicates the antibody has a clearing response against the antigen and/or associated biological entity in conjunction with the phagocytic cells (see, *e.g.*, Example IV).

52

B. Nucleic Acid Encoding Immunologic and Therapeutic Agents

Immune responses against amyloid deposits can also be induced by administration of nucleic acids encoding antibodies and their component chains used for passive immunization. Such nucleic acids can be DNA or RNA. A nucleic acid segment encoding an immunogen is typically linked to regulatory elements, such as a promoter and enhancer, that allow expression of the DNA segment in the intended target cells of a patient. For expression in blood cells, as is desirable for induction of an immune response, promoter and enhancer elements from light or heavy chain immunoglobulin genes or the CMV major intermediate early promoter and enhancer are suitable to direct expression. The linked regulatory elements and coding sequences are often cloned into a vector. For administration of double-chain antibodies, the two chains can be cloned in the same or separate vectors.

A number of viral vector systems are available including retroviral systems *(see, e.g.*, Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109 (1993)); adenoviral vectors (*see, e.g.*, Bett *et al.*, *J. Virol.* 67:5911 (1993)); adeno-associated virus vectors (see, *e.g.*, Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179:1867 (1994)), viral vectors from the pox family including vaccinia virus and the avian pox viruses, viral vectors from the alpha virus genus such as those derived from Sindbis and Semliki Forest Viruses *(see, e.g.*, Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70:508 (1996)), Venezuelan equine encephalitis virus (see Johnston *et al.*, US 5,643,576) and rhabdoviruses, such as vesicular stomatitis virus (see Rose, WO 96/34625)and papillomaviruses (Ohe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6:325 (1995); Woo *et al.*, WO 94/12629 and Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

DNA encoding an immunogen, or a vector containing the same, can be packaged into liposomes. Suitable lipids and related analogs are described by Eppstein *et al.*, US 5,208,036, Felgner *et al.*, US 5,264,618, Rose, US 5,279,833, and Epand *et al.*, US 5,283,185. Vectors and DNA encoding an immunogen can also be adsorbed to or associated with particulate carriers, examples of which include polymethyl methacrylate polymers and polylactides and poly (lactide-co-glycolides), see, *e.g.*, McGee *et al.*, *J. Micro Encap.* (1996).

Gene therapy vectors or naked polypeptides (*e.g.*, DNA) can be delivered *in vivo* by administration to an individual patient, typically by systemic administration (*e.g.*, intravenous, intraperitoneal, nasal, gastric, intradermal, intramuscular, subdermal, or intracranial infusion) or topical application (*see e.g.*, Anderson *et al.*, US 5,399,346). The term "naked polynucleotide" refers to a polynucleotide not complexed with colloidal materials. Naked polynucleotides are sometimes cloned in a plasmid vector. Such vectors can further include facilitating agents such as bupivacine (Attardo *et al.*, US 5,593,970). DNA can also be administered using a gene gun. See Xiao & Brandsma, *supra*. The DNA encoding an immunogen is precipitated onto the surface of microscopic metal beads. The microprojectiles are accelerated with a shock wave or expanding helium gas, and penetrate tissues to a depth of several cell layers. For example, The Accel™ Gene Delivery Device manufactured by Agacetus, Inc. Middleton WI is suitable. Alternatively, naked DNA can pass through skin into the blood stream simply by spotting the DNA onto skin with chemical or mechanical irritation (see Howell *et al.*, WO 95/05853).

In a further variation, vectors encoding immunogens can be delivered to cells *ex vivo*, such as cells explanted from an individual patient (*e.g.*, lymphocytes, bone marrow aspirates, tissue biopsy) or universal donor hematopoietic stem cells, followed by reimplantation of the cells into a patient, usually after selection for cells which have incorporated the vector.

II. Prophylactic and Therapeutic Methods

The present invention is directed *inter alia* to treatment of Alzheimer's and other amyloidogenic diseases by administration of therapeutic immunological reagents (*e.g.*, humanized immunoglobulins) to specific epitopes within Aβ to a patient under conditions that generate a beneficial therapeutic response in a patient (*e.g.*, induction of phagocytosis of Aβ, reduction of plaque burden, inhibition of plaque formation, reduction of neuritic dystrophy, improving cognitive function, and/or reversing, treating or preventing cognitive decline) in the patient, for example, for the prevention or treatment of an amyloidogenic disease. The invention is also directed to use of the disclosed immunological reagents (*e.g.*, humanized immunoglobulins) in the

manufacture of a medicament for the treatment or prevention of an amyloidogenic disease.

The term "treatment" as used herein, is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of disease or a predisposition toward a disease, with the purpose to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease, the symptoms of disease or the predisposition toward disease.

In one aspect, the invention provides methods of preventing or treating a disease associated with amyloid deposits of Aβ in the brain of a patient. Such diseases include Alzheimer's disease, Down's syndrome and cognitive impairment. The latter can occur with or without other characteristics of an amyloidogenic disease. Some methods of the invention entail administering an effective dosage of an antibody that specifically binds to a component of an amyloid deposit to the patient. Such methods are particularly useful for preventing or treating Alzheimer's disease in human patients. Exemplary methods entail administering an effective dosage of an antibody that binds to Aβ. Preferred methods entail administering an effective dosage of an antibody that specifically binds to an epitope within residues 1-10 of Aβ, for example, antibodies that specifically bind to an epitope within residues 1-3 of Aβ, antibodies that specifically bind to an epitope within residues 1-4 of Aβ, antibodies that specifically bind to an epitope within residues 1-5 of Aβ, antibodies that specifically bind to an epitope within residues 1-6 of Aβ, antibodies that specifically bind to an epitope within residues 1-7 of Aβ, or antibodies that specifically bind to an epitope within residues 3-7 of Aβ. In yet another aspect, the invention features administering antibodies that bind to an epitope comprising a free N-terminal residue of Aβ. In yet another aspect, the invention features administering antibodies that bind to an epitope within residues of 1-10 of Aß wherein residue 1 and/or residue 7 of Aβ is aspartic acid. In yet another aspect, the invention features administering antibodies that specifically bind to Aβ peptide without binding to full-length amyloid precursor protein (APP). In yet another aspect, the isotype of the antibody is human IgG1.

In yet another aspect, the invention features administering antibodies that bind to an amyloid deposit in the patient and induce a clearing response against the amyloid deposit. For example, such a clearing response can be effected by Fc receptor mediated phagocytosis.

Therapeutic agents of the invention are typically substantially pure from undesired contaminant. This means that an agent is typically at least about 50% w/w (weight/weight) purity, as well as being substantially free from interfering proteins and contaminants. Sometimes the agents are at least about 80% w/w and, more preferably at least 90 or about 95% w/w purity. However, using conventional protein purification techniques, homogeneous peptides of at least 99% w/w can be obtained.

The methods can be used on both asymptomatic patients and those currently showing symptoms of disease. The antibodies used in such methods can be human, humanized, chimeric or nonhuman antibodies, or fragments thereof (*e.g.*, antigen binding fragments) and can be monoclonal or polyclonal, as described herein. In yet another aspect, the invention features administering antibodies prepared from a human immunized with Aβ peptide, which human can be the patient to be treated with antibody.

In another aspect, the invention features administering an antibody with a pharmaceutical carrier as a pharmaceutical composition. Alternatively, the antibody can be administered to a patient by administering a polynucleotide encoding at least one antibody chain. The polynucleotide is expressed to produce the antibody chain in the patient. Optionally, the polynucleotide encodes heavy and light chains of the antibody. The polynucleotide is expressed to produce the heavy and light chains in the patient. In exemplary embodiments, the patient is monitored for level of administered antibody in the blood of the patient.

The invention thus fulfills a longstanding need for therapeutic regimes for preventing or ameliorating the neuropathology and, in some patients, the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease.

A. Patients Amenable to Treatment

Patients amenable to treatment include individuals at risk of disease but not showing symptoms, as well as patients presently showing symptoms. In the case of Alzheimer's disease, virtually anyone is at risk of suffering from Alzheimer's disease if he or she lives long enough. Therefore, the present methods can be administered prophylactically to the general population without the need for any assessment of the risk of the subject patient. The present methods are especially useful for individuals who have a known genetic risk of Alzheimer's disease. Such individuals include those having relatives who have experienced this disease, and those whose risk is determined by analysis of genetic or biochemical markers. Genetic markers of risk toward Alzheimer's disease include mutations in the APP gene, particularly mutations at position 717 and positions 670 and 671 referred to as the Hardy and Swedish mutations respectively (see Hardy, *supra*). Other markers of risk are mutations in the presenilin genes, PS1 and PS2, and ApoE4, family history of AD, hypercholesterolemia or atherosclerosis. Individuals presently suffering from Alzheimer's disease can be recognized from characteristic dementia, as well as the presence of risk factors described above. In addition, a number of diagnostic tests are available for identifying individuals who have AD. These include measurement of CSF tau and Aβ42 levels. Elevated tau and decreased Aβ42 levels signify the presence of AD. Individuals suffering from Alzheimer's disease can also be diagnosed by ADRDA criteria as discussed in the Examples section.

In asymptomatic patients, treatment can begin at any age (*e.g.*, 10, 20, 30). Usually, however, it is not necessary to begin treatment until a patient reaches 40, 50, 60 or 70. Treatment typically entails multiple dosages over a period of time. Treatment can be monitored by assaying antibody levels over time. If the response falls, a booster dosage is indicated. In the case of potential Down's syndrome patients, treatment can begin antenatally by administering therapeutic agent to the mother or shortly after birth.

B. Treatment Regimes and Dosages

In prophylactic applications, pharmaceutical compositions or medicaments are administered to a patient susceptible to, or otherwise at risk of, Alzheimer's disease in an amount sufficient to eliminate or reduce the risk, lessen the severity, or delay the outset of the disease, including biochemical, histologic and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. In therapeutic applications, compositions or medicants are administered to a patient suspected of, or already suffering from such a disease in an amount sufficient to cure, or at least partially arrest, the symptoms of the disease (biochemical, histologic and/or behavioral), including its complications and intermediate pathological phenotypes in development of the disease.

In some methods, administration of agent reduces or eliminates myocognitive impairment in patients that have not yet developed characteristic Alzheimer's pathology. An amount adequate to accomplish therapeutic or prophylactic treatment is defined as a therapeutically- or prophylactically-effective dose. In both prophylactic and therapeutic regimes, agents are usually administered in several dosages until a sufficient immune response has been achieved. The term "immune response" or "immunological response" includes the development of a humoral (antibody mediated) and/or a cellular (mediated by antigen-specific T cells or their secretion products) response directed against an antigen in a recipient subject. Such a response can be an active response, *i.e.*, induced by administration of immunogen, or a passive response, *i.e.*, induced by administration of immunoglobulin or antibody or primed T-cells.

An "immunogenic agent" or "immunogen" is capable of inducing an immunological response against itself on administration to a mammal, optionally in conjunction with an adjuvant. Typically, the immune response is monitored and repeated dosages are given if the immune response starts to wane.

Effective doses of the compositions of the present invention, for the treatment of the above described conditions vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Usually, the patient is a human but non-human

mammals including transgenic mammals can also be treated. Treatment dosages need to be titrated to optimize safety and efficacy.

For passive immunization with an antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg, preferably at least 1 mg/kg. Subjects can be administered such doses daily, on alternative days, weekly or according to any other schedule determined by empirical analysis. An exemplary treatment entails administration in multiple dosages over a prolonged period, for example, of at least six months. Additional exemplary treatment regimes entail administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months. Exemplary dosage schedules include 1-10 mg/kg or 15 mg/kg on consecutive days, 30 mg/kg on alternate days or 60 mg/kg weekly. In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated.

Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be weekly, monthly or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to Aβ in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of 1-1000 μg/ml and in some methods 25-300 μg/ml. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half-life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies.

The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, compositions containing the present antibodies or a cocktail thereof are administered to a patient not already in the disease state to enhance the patient's resistance. Such an amount is defined to be a "prophylactic effective dose." In this use, the precise amounts again depend upon the patient's state of health and general immunity, but generally range from 0.1 to 25 mg per dose, especially 0.5 to 2.5 mg per dose. A relatively low

dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives.

In therapeutic applications, a relatively high dosage (*e.g.*, from about 1 to 200 mg of antibody per dose, with dosages of from 5 to 25 mg being more commonly used) at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patent can be administered a prophylactic regime.

Doses for nucleic acids encoding antibodies range from about 10 ng to 1 g, 100 ng to 100 mg, 1 μg to 10 mg, or 30-300 μg DNA per patient. Doses for infectious viral vectors vary from 10-100, or more, virions per dose.

Therapeutic agents can be administered by parenteral, topical, intravenous, oral, subcutaneous, intraarterial, intracranial, intraperitoneal, intranasal or intramuscular means for prophylactic and/or therapeutic treatment. The most typical route of administration of an immunogenic agent is subcutaneous although other routes can be equally effective. The next most common route is intramuscular injection. This type of injection is most typically performed in the arm or leg muscles. In some methods, agents are injected directly into a particular tissue where deposits have accumulated, for example intracranial injection. Intramuscular injection or intravenous infusion are preferred for administration of antibody. In some methods, particular therapeutic antibodies are injected directly into the cranium. In some methods, antibodies are administered as a sustained release composition or device, such as a Medipad™ device.

Agents of the invention can optionally be administered in combination with other agents that are at least partly effective in treatment of amyloidogenic disease. In the case of Alzheimer's and Down's syndrome, in which amyloid deposits occur in the brain, agents of the invention can also be administered in conjunction with other agents that increase passage of the agents of the invention across the blood-brain barrier.

C. Pharmaceutical Compositions

Agents of the invention are often administered as pharmaceutical compositions comprising an active therapeutic agent, *i.e.*, and a variety of other pharmaceutically acceptable components. See *Remington's Pharmaceutical Science* (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). The preferred form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. The compositions can also include, depending on the formulation desired, pharmaceutically-acceptable, non-toxic carriers or diluents, which are defined as vehicles commonly used to formulate pharmaceutical compositions for animal or human administration. The diluent is selected so as not to affect the biological activity of the combination. Examples of such diluents are distilled water, physiological phosphate-buffered saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution. In addition, the pharmaceutical composition or formulation may also include other carriers, adjuvants, or nontoxic, nontherapeutic, nonimmunogenic stabilizers and the like.

Pharmaceutical compositions can also include large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides such as chitosan, polylactic acids, polyglycolic acids and copolymers (such as latex functionalized sepharose(TM), agarose, cellulose, and the like), polymeric amino acids, amino acid copolymers, and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Additionally, these carriers can function as immunostimulating agents (*i.e.*, adjuvants).

For parenteral administration, agents of the invention can be administered as injectable dosages of a solution or suspension of the substance in a physiologically acceptable diluent with a pharmaceutical carrier that can be a sterile liquid such as water oils, saline, glycerol, or ethanol. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, surfactants, pH buffering substances and the like can be present in compositions. Other components of pharmaceutical compositions are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, and mineral oil. In general, glycols such as propylene glycol or polyethylene glycol are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions. Antibodies can be administered in the form of a depot injection or implant preparation, which can be formulated in such a manner as to permit a sustained release of the active ingredient. An exemplary composition comprises monoclonal antibody at 5 mg/mL, formulated in

aqueous buffer consisting of 50 mM L-histidine, 150 mM NaCl, adjusted to pH 6.0 with HCl.

Typically, compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection can also be prepared. The preparation also can be emulsified or encapsulated in liposomes or micro particles such as polylactide, polyglycolide, or copolymer for enhanced adjuvant effect, as discussed above (see Langer, *Science* 249: 1527 (1990) and Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97 (1997)). The agents of this invention can be administered in the form of a depot injection or implant preparation, which can be formulated in such a manner as to permit a sustained or pulsatile release of the active ingredient.

Additional formulations suitable for other modes of administration include oral, intranasal, and pulmonary formulations, suppositories, and transdermal applications. For suppositories, binders and carriers include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides; such suppositories can be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1%-2%. Oral formulations include excipients, such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, and magnesium carbonate. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain 10%-95% of active ingredient, preferably 25%-70%.

Topical application can result in transdermal or intradermal delivery. Topical administration can be facilitated by co-administration of the agent with cholera toxin or detoxified derivatives or subunits thereof or other similar bacterial toxins (See Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). Co-administration can be achieved by using the components as a mixture or as linked molecules obtained by chemical crosslinking or expression as a fusion protein.

Alternatively, transdermal delivery can be achieved using a skin path or using transferosomes (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25:3521 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15 (1998)).

III. Monitoring the Course of Treatment

The invention provides methods of monitoring treatment in a patient suffering from or susceptible to Alzheimer's, *i.e.*, for monitoring a course of treatment being administered to a patient. The methods can be used to monitor both therapeutic treatment on symptomatic patients and prophylactic treatment on asymptomatic patients. In particular, the methods are useful for monitoring passive immunization (*e.g.*, measuring level of administered antibody).

Some methods entail determining a baseline value, for example, of an antibody level or profile in a patient, before administering a dosage of agent, and comparing this with a value for the profile or level after treatment. A significant increase (*i.e.*, greater than the typical margin of experimental error in repeat measurements of the same sample, expressed as one standard deviation from the mean of such measurements) in value of the level or profile signals a positive treatment outcome (*i.e.*, that administration of the agent has achieved a desired response). If the value for immune response does not change significantly, or decreases, a negative treatment outcome is indicated.

In other methods, a control value (*i.e.*, a mean and standard deviation) of level or profile is determined for a control population. Typically the individuals in the control population have not received prior treatment. Measured values of the level or profile in a patient after administering a therapeutic agent are then compared with the control value. A significant increase relative to the control value (*e.g.*, greater than one standard deviation from the mean) signals a positive or sufficient treatment outcome. A lack of significant increase or a decrease signals a negative or insufficient treatment outcome. Administration of agent is generally continued while the level is increasing relative to the control value. As before, attainment of a plateau relative to control values is an indicator that the administration of treatment can be discontinued or reduced in dosage and/or frequency.

In other methods, a control value of the level or profile (*e.g.*, a mean and standard deviation) is determined from a control population of individuals who have undergone treatment with a therapeutic agent and whose levels or profiles have plateaued in response to treatment. Measured values of levels or profiles in a patient are compared with the control value. If the measured level in a patient is not significantly

different (*e.g.*, more than one standard deviation) from the control value, treatment can be discontinued. If the level in a patient is significantly below the control value, continued administration of agent is warranted. If the level in the patient persists below the control value, then a change in treatment may be indicated.

In other methods, a patient who is not presently receiving treatment but has undergone a previous course of treatment is monitored for antibody levels or profiles to determine whether a resumption of treatment is required. The measured level or profile in the patient can be compared with a value previously achieved in the patient after a previous course of treatment. A significant decrease relative to the previous measurement (*i.e.*, greater than a typical margin of error in repeat measurements of the same sample) is an indication that treatment can be resumed. Alternatively, the value measured in a patient can be compared with a control value (mean plus standard deviation) determined in a population of patients after undergoing a course of treatment. Alternatively, the measured value in a patient can be compared with a control value in populations of prophylactically treated patients who remain free of symptoms of disease, or populations of therapeutically treated patients who show amelioration of disease characteristics. In all of these cases, a significant decrease relative to the control level (*i.e.*, more than a standard deviation) is an indicator that treatment should be resumed in a patient.

The tissue sample for analysis is typically blood, plasma, serum, mucous fluid or cerebrospinal fluid from the patient. The sample is analyzed, for example, for levels or profiles of antibodies to Aβ peptide, *e.g.*, levels or profiles of humanized antibodies. ELISA methods of detecting antibodies specific to Aβ are described in the Examples section. In some methods, the level or profile of an administered antibody is determined using a clearing assay, for example, in an *in vitro* phagocytosis assay, as described herein. In such methods, a tissue sample from a patient being tested is contacted with amyloid deposits (*e.g.*, from a PDAPP mouse) and phagocytic cells bearing Fc receptors. Subsequent clearing of the amyloid deposit is then monitored. The existence and extent of clearing response provides an indication of the existence and level of antibodies effective to clear Aβ in the tissue sample of the patient under test.

The antibody profile following passive immunization typically shows an immediate peak in antibody concentration followed by an exponential decay. Without a further dosage, the decay approaches pretreatment levels within a period of days to months depending on the half-life of the antibody administered. For example the half-life of some human antibodies is of the order of 20 days.

In some methods, a baseline measurement of antibody to Aβ in the patient is made before administration, a second measurement is made soon thereafter to determine the peak antibody level, and one or more further measurements are made at intervals to monitor decay of antibody levels. When the level of antibody has declined to baseline or a predetermined percentage of the peak less baseline (*e.g.*, 50%, 25% or 10%), administration of a further dosage of antibody is administered. In some methods, peak or subsequent measured levels less background are compared with reference levels previously determined to constitute a beneficial prophylactic or therapeutic treatment regime in other patients. If the measured antibody level is significantly less than a reference level (*e.g.*, less than the mean minus one standard deviation of the reference value in population of patients benefiting from treatment) administration of an additional dosage of antibody is indicated.

Additional methods include monitoring, over the course of treatment, any art-recognized physiologic symptom (*e.g.*, physical or mental symptom) routinely relied on by researchers or physicians to diagnose or monitor amyloidogenic diseases (*e.g.*, Alzheimer's disease). For example, one can monitor cognitive impairment. The latter is a symptom of Alzheimer's disease and Down's syndrome but can also occur without other characteristics of either of these diseases. For example, cognitive impairment can be monitored by determining a patient's score on the Mini-Mental State Exam in accordance with convention throughout the course of treatment.

C. Kits

The invention further provides kits for performing the monitoring methods described above. Typically, such kits contain an agent that specifically binds to antibodies to Aβ. The kit can also include a label. For detection of antibodies to Aβ, the label is typically in the form of labeled anti-idiotypic antibodies. For detection of antibodies, the agent can be supplied prebound to a solid phase, such as to the wells of a

microtiter dish. Kits also typically contain labeling providing directions for use of the kit. The labeling may also include a chart or other correspondence regime correlating levels of measured label with levels of antibodies to Aβ. The term labeling refers to any written or recorded material that is attached to, or otherwise accompanies a kit at any time during its manufacture, transport, sale or use. For example, the term labeling encompasses advertising leaflets and brochures, packaging materials, instructions, audio or videocassettes, computer discs, as well as writing imprinted directly on kits.

The invention also provides diagnostic kits, for example, research, detection and/or diagnostic kits (*e.g.*, for performing *in vivo* imaging). Such kits typically contain an antibody for binding to an epitope of Aβ, preferably within residues 1-10. Preferably, the antibody is labeled or a secondary labeling reagent is included in the kit. Preferably, the kit is labeled with instructions for performing the intended application, for example, for performing an *in vivo* imaging assay. Exemplary antibodies are those described herein.

D. *In vivo* Imaging

The invention provides methods of *in vivo* imaging amyloid deposits in a patient. Such methods are useful to diagnose or confirm diagnosis of Alzheimer's disease, or susceptibility thereto. For example, the methods can be used on a patient presenting with symptoms of dementia. If the patient has abnormal amyloid deposits, then the patient is likely suffering from Alzheimer's disease. The methods can also be used on asymptomatic patients. Presence of abnormal deposits of amyloid indicates susceptibility to future symptomatic disease. The methods are also useful for monitoring disease progression and/or response to treatment in patients who have been previously diagnosed with Alzheimer's disease.

The methods work by administering a reagent, such as antibody that binds to Aβ, to the patient and then detecting the agent after it has bound. Preferred antibodies bind to Aβ deposits in a patient without binding to full length APP polypeptide. Antibodies binding to an epitope of Aβ within amino acids 1-10 are particularly preferred. In some methods, the antibody binds to an epitope within amino acids 7-10 of Aβ. Such antibodies typically bind without inducing a substantial clearing response. In other methods, the antibody binds to an epitope within amino acids 1-7 of Aβ. Such

antibodies typically bind and induce a clearing response to Aβ. However, the clearing response can be avoided by using antibody fragments lacking a full-length constant region, such as Fabs. In some methods, the same antibody can serve as both a treatment and diagnostic reagent. In general, antibodies binding to epitopes C-terminal to residue 10 of Aβ do not show as strong a signal as antibodies binding to epitopes within residues 1-10, presumably because the C-terminal epitopes are inaccessible in amyloid deposits. Accordingly, such antibodies are less preferred.

Diagnostic reagents can be administered by intravenous injection into the body of the patient, or directly into the brain by intracranial injection or by drilling a hole through the skull. The dosage of reagent should be within the same ranges as for treatment methods. Typically, the reagent is labeled, although in some methods, the primary reagent with affinity for Aβ is unlabelled and a secondary labeling agent is used to bind to the primary reagent. The choice of label depends on the means of detection. For example, a fluorescent label is suitable for optical detection. Use of paramagnetic labels is suitable for tomographic detection without surgical intervention. Radioactive labels can also be detected using PET or SPECT.

Diagnosis is performed by comparing the number, size, and/or intensity of labeled loci, to corresponding baseline values. The base line values can represent the mean levels in a population of undiseased individuals. Baseline values can also represent previous levels determined in the same patient. For example, baseline values can be determined in a patient before beginning treatment, and measured values thereafter compared with the baseline values. A decrease in values relative to baseline signals a positive response to treatment.

The present invention will be more fully described by the following non-limiting examples.

EXAMPLES

Example L: Therapeutic Efficacy of Anti-Aβ Antibodies: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12 and pAb Aβ1-42

This example tests the capacity of various monoclonal and polyclonal antibodies to Aβ to inhibit accumulation of Aβ in the brain of heterozygotic transgenic mice.

A. Study Design

Sixty male and female, heterozygous PDAPP transgenic mice, 8.5 to 10.5 months of age were obtained from Charles River Laboratory. The mice were sorted into six groups to be treated with various antibodies directed to Aβ. Animals were distributed to match the gender, age, parentage and source of the animals within the groups as closely as possible. Table 2 depicts the Experimental design.

Table 2: Experimental Design

Treatment Group	N[a]	Treatment Antibody	Antibody Specificity	Antibody Isotype
1	9	none (PBS alone)	NA[b]	NA
2	10	Polyclonal	Aβ1-42	mixed
3	0	mAb[d] 2H3	Aβ1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	Aβ3-7	IgG1
5	6	mAb 266	Aβ13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	Aβ33-42	IgG2a

a. Number of mice in group at termination of the experiment. All groups started with 10 animals per group.
b. NA: not applicable
c. mouse polyclonal: anti-aggregated Aβ42
d. mAb: monoclonal antibody

As shown in Table 2, the antibodies included four murine Aβ-specific monoclonal antibodies, 2H3 (directed to Aβ residues 1-12), 10D5 (directed to Aβ residues 3-7), 266 (directed to Aβ residues 13-28 and binds to soluble but not to aggregated AN1792), 21F12 (directed to Aβ residues 33-42). A fifth group was treated with an Aβ-specific polyclonal antibody fraction (raised by immunization with aggregated AN1792). The negative control group received the diluent, PBS, alone without antibody.

B. Monitoring the Course of Treatment

The monoclonal antibodies were injected at a dose of about 10 mg/kg (assuming that the mice weighed 50 g). Antibody titers were monitored over the 28 weeks of treatment. Injections were administered intraperitoneally every seven days on average to maintain anti-Aβ titers above 1000. Although lower titers were measured for mAb 266 since it does not bind well to the aggregated AN1792 used as the capture antigen in the assay, the same dosing schedule was maintained for this group. The group receiving monoclonal antibody 2H3 was discontinued within the first three weeks since the antibody was cleared too rapidly *in vivo*.

For determination of antibody titers, a subset of three randomly chosen mice from each group were bled just prior to each intraperitoneal inoculation, for a total of 30 bleeds. Antibody titers were measured as Aβ1-42-binding antibody using a sandwich ELISA with plastic multi-well plates coated with Aβ1-42 as described in detail in the General Materials and Methods. Mean titers for each bleed are set forth in Table 3 for the polyclonal antibody and the monoclonals 10D5 and 21F12.

Table 3:

weeks 21F12	21F12	weeks 10D5	10D5	weeks poly	poly
0.15	500	0.15	3000	0.15	1600
0.5	800	0.5	14000	0.5	4000
1	2500	1	5000	1	4500
1.5	1800	1.1	5000	1.5	3000
2	1400	1.2	1300	2	1300
3	6000	2	3000	3	1600
3.5	550	3	4000	3.5	650
4	1600	3.5	500	4	1300
5	925	4	2400	5	450
6	3300	5	925	6	2100
7	4000	6	1700	7	1300
8	1400	7	1600	8	2300

9	1900	8	4000	9	700
10	1700	9	1800	10	800
11	1600	10	1800	11	600
12	1000	11	2300	12	1000
13	1500	12	2100	13	900
14	1300	13	2800	14	1900
15	1000	14	1900	15	1200
16	1700	15	2700	16	700
17	1700	16	1300	17	2100
18	5000	17	2200	18	1800
19	900	18	2200	19	1800
20	300	19	2500	20	1200
22	1750	20	980	22	1000
23	1600	22	2000	23	1200
24	1000	23	1000	24	675
25	1100	24	850	25	850
26	2250	25	600	26	1600
27	1400	26	1100	27	1900
28		27	1450	28	
		28			

Titers averaged about 1000 over this time period for the polyclonal antibody preparation and were slightly above this level for the 10D5- and 21F12-treated animals.

Treatment was continued over a six-month period for a total of 196 days. Animals were euthanized one week after the final dose.

C. Aβ and APP Levels in the Brain:

Following about six months of treatment with the various anti-Aβ antibody preparations, brains were removed from the animals following saline perfusion. One hemisphere was prepared for immunohistochemical analysis and the second was used for the quantitation of Aβ and APP levels. To measure the concentrations of various forms of beta amyloid peptide and amyloid precursor protein (APP), the hemisphere was dissected and homogenates of the hippocampal, cortical, and cerebellar regions were prepared in 5M guanidine. These were serially diluted and the level of amyloid peptide or APP was quantitated by comparison to a series of dilutions of standards of Aβ peptide or APP of known concentrations in an ELISA format.

The levels of total Aβ and of Aβ1-42 measured by ELISA in homogenates of the cortex, and the hippocampus and the level of total Aβ in the cerebellum are shown in Tables 4, 5, and 6, respectively. The median concentration of

total Aβ for the control group, inoculated with PBS, was 3.6-fold higher in the hippocampus than in the cortex (median of 63,389 ng/g hippocampal tissue compared to 17,818 ng/g for the cortex). The median level in the cerebellum of the control group (30.6 ng/g tissue) was more than 2,000-fold lower than in the hippocampus. These levels are similar to those previously reported for heterozygous PDAPP transgenic mice of this age (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

For the cortex, one treatment group had a median Aβ level, measured as Aβ1-42, which differed significantly from that of the control group ($p < 0.05$), those animals receiving the polyclonal anti-Aβ antibody as shown in Table 4. The median level of Aβ1-42 was reduced by 65%, compared to the control for this treatment group. The median levels of Aβ1-42 were also significantly reduced by 55% compared to the control in one additional treatment group, those animals dosed with the mAb 10D5 ($p = 0.0433$).

Table 4

CORTEX

Treatment Group	N[a]	Medians						Means	
		Total Aβ			Aβ42			Total Aβ	Aβ42
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value	P value	% Change	ELISA value	ELISA value
PBS	9	17818	NA[d]	NA	13802	NA	NA	16150+/-7456[e]	12621+/-5738
Polyclonal anti-Aβ42	10	6160	0.0055	-65	4892	0.0071	-65	5912+/-4492	4454+/-3347
mAb 10D5	8	7915	0.1019	-56	6214	0.0433	-55	9695+/-6929	6943+/-3351
mAb 266	6	9144	0.1255	-49	8481	0.1255	-39	9204+/-9293	7489+/-6921
mAb 21F12	8	15158	0.2898	-15	13578	0.7003	-2	12481+/-7082	11005+/-6324

Footnotes:
a. Number of animals per group at the end of the experiment
b. ng/g tissue
c. Mann Whitney analysis
d. NA: not applicable
e. Standard Deviation

In the hippocampus, the median percent reduction of total Aβ associated with treatment with polyclonal anti-Aβ antibody (50%, p = 0.0055) was not as great as that observed in the cortex (65%) (Table 5). However, the absolute magnitude of the reduction was almost 3-fold greater in the hippocampus than in the cortex, a net reduction of 31,683 ng/g tissue in the hippocampus versus 11,658 ng/g tissue in the cortex. When measured as the level of the more amyloidogenic form of Aβ, Aβ1-42, rather than as total Aβ, the reduction achieved with the polyclonal antibody was significant (p = 0.0025). The median levels in groups treated with the mAbs 10D5 and 266 were reduced by 33% and 21%, respectively.

Table 5

HIPPOCAMPUS									
Treatment Group	N[a]	Medians						Means	
		Total Aβ			Aβ42			Total Aβ	Aβ42
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value	P value	% Change	ELISA value	ELISA value
PBS	9	63389	NA[d]	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308[e]	52801+/-14701
Polyclonal anti-Aβ42	10	31706	0.0055	-50	27127	0.0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
mAb 10D5	8	46779	0.0675	-26	36290	0.0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
mAb 266	6	48689	0.0990	-23	43034	0.0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
mAb 21F12	8	51563	0.7728	-19	47961	0.8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

a. Number of animals per group at the end of the experiment
b. ng/g tissue
c. Mann Whitney analysis
d. NA: not applicable
e. Standard Deviation

Total Aβ was also measured in the cerebellum (Table 6). Those groups dosed with the polyclonal anti-Aβ and the 266 antibody showed significant reductions of the levels of total Aβ (43% and 46%, p = 0.0033 and p = 0.0184, respectively) and that group treated with 10D5 had a near significant reduction (29%, p = 0.0675).

Table 6

CEREBELLUM					
Treatment Group	N[a]	Medians			Means
		Total Aβ			Total Aβ
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value
PBS	9	30.64	NA[d]	NA	40.00+/-31.89[e]
Polyclonal anti-Aβ42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

a. Number of animals per group at the end of the experiment
b. ng/g tissue
c. Mann Whitney analysis
d. NA: not applicable
e. Standard Deviation

APP concentration was also determined by ELISA in the cortex and cerebellum from antibody-treated and control, PBS-treated mice. Two different APP assays were utilized. The first, designated APP-α/FL, recognizes both APP-alpha (α, the secreted form of APP which has been cleaved within the Aβ sequence), and full-length forms (FL) of APP, while the second recognizes only APP-α. In contrast to the treatment-associated diminution of Aβ in a subset of treatment groups, the levels of APP

were virtually unchanged in all of the treated compared to the control animals. These results indicate that the immunizations with Aβ antibodies deplete Aβ without depleting APP.

In summary, Aβ levels were significantly reduced in the cortex, hippocampus and cerebellum in animals treated with the polyclonal antibody raised against AN1792. To a lesser extent monoclonal antibodies to the amino terminal region of Aβ1-42, specifically amino acids 1-16 and 13-28 also showed significant treatment effects.

D. Histochemical Analyses:

The morphology of Aβ-immunoreactive plaques in subsets of brains from mice in the PBS, polyclonal Aß42, 21F12, 266 and 10D5 treatment groups was qualitatively compared to that of previous studies in which standard immunization procedures with Aβ42 were followed.

The largest alteration in both the extent and appearance of amyloid plaques occurred in the animals immunized with the polyclonal Aβ42 antibody. The reduction of amyloid load, eroded plaque morphology and cell-associated Aβ immunoreactivity closely resembled effects produced by the standard immunization procedure. These observations support the ELISA results in which significant reductions in both total Aβ and Aβ42 were achieved by administration of the polyclonal Aβ42 antibody.

In similar qualitative evaluations, amyloid plaques in the 10D5 group were also reduced in number and appearance, with some evidence of cell-associated Aβ immunoreactivity. Relative to control-treated animals, the polyclonal Ig fraction against Aβ and one of the monoclonal antibodies (10D5) reduced plaque burden by 93% and 81%, respectively ($p<0.005$). 21F12 appeared to have a relatively modest effect on plaque burden. Micrographs of brain after treatment with $pAbA\beta_{1-42}$ show diffuse deposits and absence of many of the larger compacted plaques in the $pAbA\beta_{1-42}$ treated group relative to control treated animals.

E. Lymphoproliferative Responses

Aβ-dependent lymphoproliferation was measured using spleen cells harvested eight days following the final antibody infusion. Freshly harvested cells, 10^5 per well, were cultured for 5 days in the presence of Aβ1-40 at a concentration of 5 μM for stimulation. As a positive control, additional cells were cultured with the T cell mitogen, PHA, and, as a negative control, cells were cultured without added peptide.

Splenocytes from aged PDAPP mice passively immunized with various anti-Aβ antibodies were stimulated *in vitro* with AN1792 and proliferative and cytokine responses were measured. The purpose of these assays was to determine if passive immunization facilitated antigen presentation, and thus priming of T cell responses specific for AN1792. No AN1792-specific proliferative or cytokine responses were observed in mice passively immunized with the anti-Aβ antibodies.

Example II: Therapeutic Efficacy of Anti-Aβ Antibodies: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12, mAb 3D6, mAb 16C11 and pAb Aβ1-42

In a second study, treatment with 10D5 was repeated and two additional anti-Aβ antibodies were tested, monoclonals 3D6 (Aβ1-5) and 16C11 (Aβ33-42). Control groups received either PBS or an irrelevant isotype-matched antibody (TM2a). The mice were older (11.5-12 month old heterozygotes) than in the previous study, otherwise the experimental design was the same. Once again, after six months of treatment, 10D5 reduced plaque burden by greater than 80% relative to either the PBS or isotype-matched antibody controls (p=0.003). One of the other antibodies against Aβ, 3D6, was equally effective, producing an 86% reduction (p=0.003). In contrast, the third antibody against the peptide, 16C11, failed to have any effect on plaque burden. Similar findings were obtained with Aβ42 ELISA measurements.

These results demonstrate that an antibody response against Aβ peptide, in the absence of T cell immunity, is sufficient to decrease amyloid deposition in PDAPP mice, but that not all anti-Aβ antibodies are equally efficacious. Antibodies directed to epitopes comprising amino acids 1-5 or 3-7 of Aβ are particularly efficacious. In summary, it can be demonstrated that passively administered antibodies against Aβ (*i.e.*,

passive immunization) reduces the extent of plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease.

Example III: Monitoring of Antibody Binding in the CNS

This Example demonstrates that when held at modest serum concentrations (25–70 μg/ml), the antibodies gained access to the CNS at levels sufficient to decorate β-amyloid plaques.

To determine whether antibodies against Aβ could be acting directly within the CNS, brains taken from saline-perfused mice at the end of the Example II, were examined for the presence of the peripherally-administered antibodies. Unfixed cryostat brain sections were exposed to a fluorescent reagent against mouse immunoglobulin (goat anti-mouse IgG-Cy3). Plaques within brains of the 10D5 and 3D6 groups were strongly decorated with antibody, while there was no staining in the 16C11 group. To reveal the full extent of plaque deposition, serial sections of each brain were first immunoreacted with an anti-Aβ antibody, and then with the secondary reagent. 10D5 and 3D6, following peripheral administration, gained access to most plaques within the CNS. The plaque burden was greatly reduced in these treatment groups compared to the 16C11 group. Antibody entry into the CNS was not due to abnormal leakage of the blood-brain barrier since there was no increase in vascular permeability as measured by Evans Blue in PDAPP mice. In addition, the concentration of antibody in the brain parenchyma of aged PDAPP mice was the same as in non-transgenic mice, representing 0.1% of the antibody concentration in serum (regardless of isotype).

These data indicate that peripherally administered antibodies can enter the CNS where they can directly trigger amyloid clearance. It is likely that 16C11 also had access to the plaques but was unable to bind.

Example IV: *Ex vivo* Screening Assay for Activity of an Antibody Against Amyloid Deposits

To examine the effect of antibodies on plaque clearance, we established an *ex vivo* assay in which primary microglial cells were cultured with unfixed cryostat sections of either PDAPP mouse or human AD brains. Microglial cells were obtained

from the cerebral cortices of neonate DBA/2N mice (1-3 days). The cortices were mechanically dissociated in HBSS⁻ (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma) with 50 µg/ml DNase I (Sigma). The dissociated cells were filtered with a 100 µm cell strainer (Falcon), and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The pellet was resuspended in growth medium (high glucose DMEM, 10%FBS, 25ng/ml rmGM-CSF), and the cells were plated at a density of 2 brains per T-75 plastic culture flask. After 7-9 days, the flasks were rotated on an orbital shaker at 200 rpm for 2h at 37°C. The cell suspension was centrifuged at 1000rpm and resuspended in the assay medium.

10-µm cryostat sections of PDAPP mouse or human AD brains (post-mortem interval < 3hr) were thaw mounted onto poly-lysine coated round glass coverslips and placed in wells of 24-well tissue culture plates. The coverslips were washed twice with assay medium consisting of H-SFM (Hybridoma-serum free medium, Gibco BRL) with 1% FBS, glutamine, penicillin/streptomycin, and 5ng/ml rmGM-CSF (R&D). Control or anti-Aβ antibodies were added at a 2x concentration (5 µg/ml final) for 1 hour. The microglial cells were then seeded at a density of 0.8x 10^6 cells/ml assay medium. The cultures were maintained in a humidified incubator (37°C, 5%CO_2) for 24hr or more. At the end of the incubation, the cultures were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton-X100. The sections were stained with biotinylated 3D6 followed by a streptavidin / Cy3 conjugate (Jackson ImmunoResearch). The exogenous microglial cells were visualized by a nuclear stain (DAPI). The cultures were observed with an inverted fluorescent microscope (Nikon, TE300) and photomicrographs were taken with a SPOT digital camera using SPOT software (Diagnostic instruments). For Western blot analysis, the cultures were extracted in 8M urea, diluted 1:1 in reducing tricine sample buffer and loaded onto a 16% tricine gel (Novex). After transfer onto immobilon, blots were exposed to 5 µg/ml of the pabAβ42 followed by an HRP-conjugated anti-mouse antibody, and developed with ECL (Amersham)

When the assay was performed with PDAPP brain sections in the presence of 16C11 (one of the antibodies against Aβ that was not efficacious *in vivo*), β-amyloid plaques remained intact and no phagocytosis was observed. In contrast, when adjacent sections were cultured in the presence of 10D5, the amyloid deposits were largely gone and the microglial cells showed numerous phagocytic vesicles containing

Aβ. Identical results were obtained with AD brain sections; 10D5 induced phagocytosis of AD plaques, while 16C11 was ineffective. In addition, the assay provided comparable results when performed with either mouse or human microglial cells, and with mouse, rabbit, or primate antibodies against Aβ.

Table 7 compares Aβ binding versus phagocytosis for several different antibody binding specificities. It can be seen that antibodies binding to epitopes within aa 1-7 both bind and clear amyloid deposits, whereas antibodies binding to epitopes within amino acids 4-10 bind without clearing amyloid deposits. Antibodies binding to epitopes C-terminal to residue 10 neither bind nor clear amyloid deposits.

Table 7: Analysis of Epitope Specificity

	Antibody			
	epitope	isotype	Staining	Phagocytosis
N-Term				
mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-7	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	rat IgG1	+	-
aa 13-28				
18G11	10-18	rat IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-Term				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
Immune serum				
rabbit (CFA)	1-6		+	+
mouse (CFA)	3-7		+	+
mouse (QS-21)	3-7		+	+
monkey (QS-21)	1-5		+	+
mouse (MAP1-7)			+	+

Table 8 shows results obtained with several antibodies against Aβ, comparing their abilities to induce phagocytosis in the *ex vivo* assay and to reduce *in vivo* plaque burden in passive transfer studies. Although 16C11 and 21F12 bound to aggregated synthetic Aβ peptide with high avidity, these antibodies were unable to react with β-amyloid plaques in unfixed brain sections, could not trigger phagocytosis in the *ex vivo* assay, and were not efficacious *in vivo*. 10D5, 3D6, and the polyclonal antibody against Aβ were active by all three measures. These results show that efficacy *in vivo* is due to direct antibody mediated clearance of the plaques within the CNS, and that the *ex vivo* assay is predictive of *in vivo* efficacy.

Table 8: The *ex vivo* assay as predictor of *in vivo* efficacy

Antibody	Isotype	Avidity for aggregated Aβ (pM)	Binding to β-amyloid plaques	*Ex vivo* efficacy	*In vivo* efficacy
monoclonal					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
polyclonal					
1-42	mix	600	+	+	+

The same assay has been used to test clearing activity of an antibody against a fragment of synuclein referred to as NAC. Synuclein has been shown to be an amyloid plaque-associated protein. An antibody to NAC was contacted with a brain tissue sample containing amyloid plaques, and microglial cells, as before. Rabbit serum was used as a control. Subsequent monitoring showed a marked reduction in the number and size of plaques indicative of clearing activity of the antibody.

Confocal microscopy was used to confirm that Aβ was internalized during the course of the *ex vivo* assay. In the presence of control antibodies, the exogenous microglial cells remained in a confocal plane above the tissue, there were no

phagocytic vesicles containing Aβ, and the plaques remained intact within the section. In the presence of 10D5, nearly all plaque material was contained in vesicles within the exogenous microglial cells. To determine the fate of the internalized peptide, 10D5 treated cultures were extracted with 8M urea at various time-points, and examined by Western blot analysis. At the one hour time point, when no phagocytosis had yet occurred, reaction with a polyclonal antibody against Aβ revealed a strong 4 kD band (corresponding to the Aβ peptide). Aβ immunoreactivity decreased at day 1 and was absent by day 3. Thus, antibody-mediated phagocytosis of Aβ leads to its degradation.

To determine if phagocytosis in the *ex vivo* assay was Fc-mediated, F(ab')2 fragments of the anti-Aß antibody 3D6 were prepared. Although the F(ab')2 fragments retained their full ability to react with plaques, they were unable to trigger phagocytosis by microglial cells. In addition, phagocytosis with the whole antibody could be blocked by a reagent against murine Fc receptors (anti-CD16/32). These data indicate that *in vivo* clearance of Aβ occurs through Fc-receptor mediated phagocytosis.

Example V: Passage of Antibodies Through the Blood-Brain Barrier

This example determines the concentration of antibody delivered to the brain following intravenous injection into a peripheral tissue of either normal or PDAPP mice. Following treatment, PDAPP or control normal mice were perfused with 0.9% NaCl. Brain regions (hippocampus or cortex) were dissected and rapidly frozen. Brain were homogenized in 0.1% triton + protease inhibitors. Immunoglobulin was detected in the extracts by ELISA. F(ab)'2 goat anti-mouse IgG were coated onto an RIA plate as capture reagent. The serum or the brain extracts were incubated for 1hr. The isotypes were detected with anti-mouse IgG1-HRP or IgG2a-HRP or IgG2b-HRP (Caltag). Antibodies, regardless of isotype, were present in the CNS at a concentration that is 1:1000 that found in the blood. For example, when the concentration of IgG1 was three times that of IgG2a in the blood, it was three times IgG2a in the brain as well, both being present at 0.1% of their respective levels in the blood. This result was observed in both transgenic and nontransgenic mice indicating that the PDAPP does not have a uniquely leak blood brain barrier.

Example VI. Cloning and Sequencing of the Mouse 3D6 Variable Regions

Cloning and Sequence Analysis of 3D6 VH. The heavy chain variable VH region of 3D6 was cloned by RT-PCR using mRNA prepared from hybridoma cells by two independent methods. In the first, consensus primers were employed to VH region leader peptide encompassing the translation initiation codon as the 5' primer (DNA #3818-3829), and a g2b (DNA #3832) constant regions specific 3' primer. The sequences from PCR amplified product, as well as from multiple, independently-derived clones, were in complete agreement with one another. As a further check on the sequence of the 3D6 VH region, the result was confirmed by sequencing a VH fragment obtained by 5' RACE RT-PCR methodology and the 3' g2b specific primer (DNA #3832). Again, the sequence was derived from the PCR product, as well as multiple, independently-isolated clones. Both sequences are in complete agreement with one another, (with the exception of V8I substitution in the leader region from the 5' RACE product), indicating that the sequences are derived from the mRNA encoding the VH region of 3D6. The nucleotide (SEQ ID NO:3) and amino acid sequence (SEQ ID NO:4) of the VH region of 3D6 are set forth in Table 9A and in Figure 2, respectively.

Table 9A: Mouse 3D6 VH Nucleotide Sequence

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA
AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAAT
TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAACCTACTA
TTCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGT
ACCTGCAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTGTCAGATAT
GATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACT (SEQ ID NO:3)

*Leader peptide is underlined.

Cloning and Sequence Analysis of 3D6 VL. The light chain variable VL region of 3D6 was cloned in an analogous manner as the VH region. In the first trial, a consensus primer set was designed for amplification of murine VL regions as follows: 5' primers (DNA #3806-3816) were designed to hybridize to the VL region encompassing the translation initiation codon, and a 3' primer (DNA#3817) was specific

for the murine Ck region downstream of the V-J joining region. DNA sequence analysis of the PCR fragment, as well as independently-derived clones isolated using this consensus light chain primer set, revealed that the cDNA obtained was derived from a non-functionally rearranged message as the sequence contained a frameshift mutation between the V-J region junction.

In a second trial, 5'RACE was employed to clone a second VL encoding cDNA. DNA sequence analysis of this product (consensus 11) showed it encoded a functional mRNA. Thus, it can be concluded that the sequence encodes the correct 3D6 light chain mRNA. The nucleotide (SEQ ID NO:1) and amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of the VL region of 3D6 are set forth in Table 9B and in Figure 1, respectively.

Table 9B: Mouse 3D6 VL Nucleotide Sequence

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGG
TTATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCT
CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACT
GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGA
AAATCAGCAGAATAGAGGCTGAGGATTTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
TTTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:1)

*Leader peptide is underlined

Primers used for the cloning of the 3D6 VL cDNA are set forth in Table 10.

DNA	Size	Coding Strand?	DNA Sequence	Comments
3806	40	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GTT.GCC.TGT.TAG.GCT.GTT.GGT.GCT.G (SEQ ID NO:39)	mouse kappa variable primer 1 MKV PRIMER 1, MRC set; % A+T = 50.00 [20]; % C+G = 50.00 [20] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 72.90

3807	39	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.GWC.AGA.CAC.ACT.CCT.GYT.ATG.GGT (SEQ ID NO:40)	mouse kappa variable primer 2 MKV PRIMER 2, MRC set % A+T = 46.15 [18]; % C+G = 48.72 [19] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 72.05
3808	40	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.TGT.GCT.CAC.TCA.GGT.CCT.GGS.GTT.G (SEQ ID NO:41)	mouse kappa variable primer 3 MKV PRIMER 3, MRC set; % A+T = 45.00 [18]; % C+G = 52.50 [21] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 73.93
3809	43	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GRC.CCC.TGC.TCA.GWT.TYT.TGG.MWT.CTT.G (SEQ ID NO:42)	mouse kappa variable primer 4 MKV PRIMER 4, MRC set; % A+T = 41.86 [18]; % C+G = 46.51 [20] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 72.34
3810	40	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.WCA.GGT.GCA.GAT.TWT.CAG.CTT.C (SEQ ID NO:43)	mouse kappa variable primer 5 MKV PRIMER 5, MRC set % A+T = 52.50 [21]; % C+G = 42.50 [17] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 69.83
3811	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.GTK.CYY.TGY.TSA.GYT.YCT.GRG.G (SEQ ID NO:44)	mouse kappa variable primer 6 MKV PRIMER 6, MRC set; % A+T = 37.84 [14]; % C+G = 40.54 [15] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 68.01
3812	41	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CWT.CAA.GAT.GGA.GTC.ACA.KWY.YCW.GG (SEQ ID NO:45)	mouse kappa variable primer 7 MKV PRIMER 7, MRC set; % A+T = 39.02 [16]; % C+G = 46.34 [19] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 71.70
3813	41	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GTG.GGG.AYC.TKT.TTY.CMM.TTT.TTC.AAT.TG (SEQ ID NO:46)	mouse kappa variable primer 8 MKV PRIMER 8, MRC set; % A+T = 53.66 [22]; % C+G = 34.15 [14] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.70

3814	35	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGT.RTC.CWC.ASC.TCA.GTT.CCT.TG (SEQ ID NO:47)	mouse kappa variable primer 9 MKV PRIMER 9, MRC set. % A+T = 45.71 [16]; % C+G = 45.71 [16] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 69.36
3815	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GTA.TAT.ATG.TTT.GTT.GTC.TAT.TTC.T (SEQ ID NO:48)	mouse kappa variable primer 10 MKV PRIMER 10, MRC set; % A+T = 70.27 [26]; % C+G = 29.73 [11] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 63.58
3816	38	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.AGC.CCC.AGC.TCA.GCT.TCT.CTT.CC (SEQ ID NO:49)	mouse kappa variable primer 11 MKV PRIMER 11, MRC set; % A+T = 44.74 [17]; % C+G = 55.26 [21] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 74.40
3817	27	No	GGA.TCC.CGG.GTG.GAT.GGT.GGG.AAG.ATG (SEQ ID NO:50)	mouse kappa light chain reverse primer, aa 116-122; Ck constant region primer, MRC set+SmaI site; % A+T = 47.06 [8]; % C+G = 52.94 [9] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 57.19
3818	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.ATG.CAG.CTG.GGT.CAT.STT.CTT.C (SEQ ID NO:51)	mouse heavy variable primer 1 MHV primer 1, MRC set;
3819	36	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.ATG.GAG.CTR.TAT.CAT.SYT.CTT (SEQ ID NO:52)	mouse heavy variable primer 2 MHV primer 2, MRC set;
3820	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAA.GWT.GTG.GTT.AAA.CTG.GGT.TTT.T (SEQ ID NO:53)	mouse heavy variable primer 3 MHV primer 3, MRC set;
3821	35	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GRA.CTT.TGG.GYT.CAG.CTT.GRT.TT (SEQ ID NO:54)	mouse heavy variable primer 4 MHV primer 4, MRC set;
3822	40	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.CTC.CAG.GCT.CAA.TTT.AGT.TTT.CCT.T (SEQ ID NO:55)	mouse heavy variable primer 5 MHV primer 5, MRC set;

3823	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGC.TGT.CYT.RGS.GCT.RCT.CTT.CTG.C (SEQ ID NO:56)	mouse heavy variable primer 6 MHV primer 6, MRC set;
3824	36	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGR.ATG.GAG.CKG.GRT.CTT.TMT.CTT (SEQ ID NO:57)	mouse heavy variable primer 7 MHV primer 7, MRC set;
3825	33	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAG.AGT.GCT.GAT.TCT.TTT.GTG (SEQ ID NO:58)	mouse heavy variable primer 8 MHV primer 8, MRC set;
3826	40	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGM.TTG.GGT.GTG.GAM.CTT.GCT.ATT.CCT.G (SEQ ID NO:59)	mouse heavy variable primer 9 MHV primer 9, MRC set;
3827	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGG.CAG.ACT.TAC.ATT.CTC.ATT.CCT.G (SEQ ID NO:60)	mouse heavy variable primer 10 MHV primer 10, MRC set;
3828	38	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GGA.TTT.TGG.GCT.GAT.TTT.TTT.TAT.TG (SEQ ID NO:61)	mouse heavy variable primer 11 MHV primer 11, MRC set;
3829	37	Yes	ACT.AGT.CGA.CAT.GAT.GGT.GTT.AAG.TCT.TCT.GTA.CCT.G (SEQ ID NO:62)	mouse heavy variable primer 12 MHV primer 12, MRC set;
3832	27	No	GGA.TCC.CGG.GAG.TGG.ATA.GAC.tGA.TGG (SEQ ID NO:63)	mouse IgG2b heavy chain reverse primer aa position 119-124, MRC set;

From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with the numbering convention of Kabat *et al.*, *supra.*

Expression of Chimeric 3D6 Antibody: The variable heavy and light chain regions were re-engineered to encode splice donor sequences downstream of the respective VDJ or VJ junctions, and cloned into the mammalian expression vector pCMV-hγ1 for the heavy chain, and pCMV-hκ1 for the light chain. These vectors encode human γ1 and Ck constant regions as exonic fragments downstream of the

inserted variable region cassette. Following sequence verification, the heavy chain and light chain expression vectors were co-transfected into COS cells. Two different heavy chain clones (H2.2 & H3.2) were independently co-transfected with 3 different chimeric light chain clones (L3, L4, &L10) to confirm reproducibility of the result. A chimeric 21.6 antibody transfection was carried out as a positive control for the vectors. Conditioned media was collected 48 hrs post transfection and assayed by western blot analysis for antibody production or ELISA for Aβ binding.

The multiple transfectants all expressed heavy chain + light chain combinations which are recognized by a goat anti-human IgG (H+L) antibody on a western blot.

Direct binding of 3D6 and chimeric 3D6 (PK1614) antibodies to Aβ was tested by ELISA analysis. Chimeric 3D6 was found to bind to Aβ with high avidity, similar to that demonstrated by 3D6 (Figure 3A). Furthermore, an ELISA based competitive inhibition assay revealed that the chimeric 3D6 and the murine 3D6 antibody competed equally with biotinylated-3D6 binding to Aβ (Figure 3B). The chimeric antibody displayed binding properties indistinguishable from the 3D6 reference sample.

Table 11.

Conc (µg/ml)	3D6	PK1614	IgG1
0.037		119.3	
0.11	118.8	118.9	
0.33	99.7	71.25	
1	98.63	84.53	134.4

Moreover, both 3D6 and PK1614 were effective at clearing Aβ plaques. The *ex vivo* assay demonstrates that as the concentration of antibody increases, the amount of Aβ decreases in a similar manner for both murine and chimeric 3D6 antibodies. Hence, it can be concluded that the sequences encode functional 3D6 heavy chain and light chains respectively.

Example VII. 3D6 Humanization

Homology/Molecular Modeling. In order to identify key structural framework residues in the murine 3D6 antibody, a three-dimensional model was

generated based on the closest murine antibodies for the heavy and light chains. For this purpose, an antibody designated 1CR9 was chosen as a template for modeling the 3D6 light chain (PDB ID: 1CR9, Kanyo *et al., supra*), and an antibody designated 1OPG was chosen as the template for modeling the heavy chain. (PDB ID: 1OPG Kodandapani *et al., supra*). (See also Table 1.) Amino acid sequence alignment of 3D6 with the light chain and heavy chain of these antibodies revealed that, with the exception of CDR3 of the heavy chain, the 1CR9 and 1OPG antibodies share significant sequence homology with 3D6. In addition, the CDR loops of the selected antibodies fall into the same canonical Chothia structural classes as do the CDR loops of 3D6, again excepting CDR3 of the heavy chain. Therefore, 1CR9 and 1OPG were initially selected as antibodies of solved structure for homology modeling of 3D6.

A first pass homology model of 3D6 variable region based on the antibodies noted above was constructed using the Look & SegMod Modules GeneMine (v3.5) software package. This software was purchased under a perpetual license from Molecular Applications Group (Palo Alto, CA). This software package, authored by Drs. Michael Levitt and Chris Lee, facilitates the process of molecular modeling by automating the steps involved in structural modeling a primary sequence on a template of known structure based on sequence homology. Working on a Silicon Graphics IRIS workstation under a UNIX environment, the modeled structure is automatically refined by a series of energy minimization steps to relieve unfavorable atomic contacts and optimize electrostatic and van der Walls interactions.

A further refined model was built using the modeling capability of Quanta®. A query of the PDB database with CDR3 of the heavy chain of 3D6 identified 1qkz as most homologous and having the identical number of residues as 3D6. Hence, CDR3 of the heavy chain of 3D6 was modeled using the crystal structure of 1qkz as template. The α-carbon backbone trace of the 3D6 model is shown in Figure 4. The VH domain is shown as a stippled line, and VL domain is shown as a solid line, and CDR loops are indicated in ribbon form.

Selection of Human Acceptor Antibody Sequences. Suitable human acceptor antibody sequences were identified by computer comparisons of the amino acid sequences of the mouse variable regions with the sequences of known human antibodies.

The comparison was performed separately for the 3D6 heavy and light chains. In particular, variable domains from human antibodies whose framework sequences exhibited a high degree of sequence identity with the murine VL and VH framework regions were identified by query of the Kabat Database using NCBI BLAST (publicly accessible through the National Institutes of Health NCBI internet server) with the respective murine framework sequences.

Two candidate sequences were chosen as acceptor sequences based on the following criteria: (1) homology with the subject sequence; (2) sharing canonical CDR structures with the donor sequence; and (3) not containing any rare amino acid residues in the framework regions. The selected acceptor sequence for VL is Kabat ID Number (KABID) 019230 (Genbank Accession No. S40342), and for VH is KABID 045919 (Genbank Accession No. AF115110). First versions of humanized 3D6 antibody utilize these selected acceptor antibody sequences.

Substitution of Amino Acid Residues. As noted *supra*, the humanized antibodies of the invention comprise variable framework regions substantially from a human immunoglobulin (acceptor immunoglobulin) and complementarity determining regions substantially from a mouse immunoglobulin (donor immunoglobulin) termed 3D6. Having identified the complementarity determining regions of 3D6 and appropriate human acceptor immunoglobulins, the next step was to determine which, if any, residues from these components to substitute to optimize the properties of the resulting humanized antibody. The criteria described *supra* were used to select residues for substitution.

Figures 1 and 2 depict alignments of the original murine 3D6 VL and VH, respectively, with the respective version 1 of the humanized sequence, the corresponding human framework acceptor sequence and, lastly, the human germline V region sequence showing highest homology to the human framework acceptor sequence. The shaded residues indicate the canonical (solid fill), vernier (dotted outline), packing (bold), and rare amino acids (bold italics), and are indicated on the figure. The asterisks indicate residues backmutated to murine residues in the human acceptor framework sequence, and CDR regions are shown overlined. A summary of the changes incorporated into version 1 of humanized 3D6 VH and VL is presented in Table 12.

Table 12. Summary of changes in humanized 3D6.v1

Changes	VL (112 residues)	VH (119 residues)
Hu->Mu: Framework	4/112	3/119 (1 canon, 1 packing)
CDR1	6/16	3/5
CDR2	4/7	7/14
CDR3	5/8	4/10
Hu->Mu	19/112 (17%)	17/119 (14%)
Mu->Hu: Framework	13/112	14/119
Backmutation notes	1. I2V which is a canonical position. 2. Y36L which is a packing residue and also lies under the CDRs 3. L46R which is a packing residue and lies beneath the CDRs	4. S49A Vernier/beneath the CDRs. 5. A93V which is a packing and vernier zone residue 6. K94R which is a canonical residue
Acceptor notes	7. KABID 019230/Genbank Acc#S40342 8. Hu κ LC subgroup II 9. CDRs from same canonical structural group as donor (m3D6) L1=class 4 L2=class 1 L3=class1 10. Unknown specificity	11. KABID045919/Genbank Acc#AF115110 12. Hu HC subgroup III 13. CDRs from same canonical structural group as donor (m3D6) H1=class 1 H2=class3 14. Recognizes capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis
Acceptor Germline	15. VH3-23	16. A3 & A19

Tables 13 and 14 set forth Kabat numbering keys for the various light and heavy chains, respectively.

Table 13: Key to Kabat Numbering for Light Chain

KAB #	#	TYPE	mouse 3D6 VL	HUM 3D6VL	KABID 019230	A19-Germ-line	Comment
1	1	FR1	Y	Y	D	D	Rare mouse, may contact CDR
2	2		V	V	I	I	Canonical/CDR contact
3	3		V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		T	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		S	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	
14	14		T	T	T	T	
15	15		I	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	
17	17		Q	E	E	E	
18	18		P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	
23	23		C	C	C	C	

24	24	CDR1	K	K	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		L	L	L	L	
27C	30		L	L	L	L	
27D	31		D	D	H	H	
27E	32		S	S	S	S	
28	33		D	D	N	N	
29	34		G	G	G	G	
30	35		K	K	Y	Y	
31	36		T	T	N	N	
32	37		Y	Y	Y	Y	
33	38		L	L	L	L	
34	39		N	N	D	D	
35	40	FR2	W	W	W	W	
36	41		L	L	Y	Y	Packing residue
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	
39	44		R	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		R	R	L	L	Packing residue
47	52		L	L	L	L	
48	53		I	I	I	I	
49	54		Y	Y	Y	Y	
50	55	CDR2	L	L	L	L	
51	56		V	V	G	G	
52	57		S	S	S	S	
53	58		K	K	N	N	
54	59		L	L	R	R	
55	60		D	D	A	A	
56	61		S	S	S	S	

92
93

57	62	FR3	G	G	G	G
58	63		V	V	V	V
59	64		P	P	P	P
60	65		D	D	D	D
61	66		R	R	R	R
62	67		F	F	F	F
63	68		T	S	S	S
64	69		G	G	G	G
65	70		S	S	S	S
66	71		G	G	G	G
67	72		S	S	S	S
68	73		G	G	G	G
69	74		T	T	T	T
70	75		D	D	D	D
71	76		F	F	F	F
72	77		T	T	T	T
73	78		L	L	L	L
74	79		K	K	K	K
75	80		I	I	I	I
76	81		S	S	S	S
77	82		R	R	R	R
78	83		I	V	V	V
79	84		E	E	E	E
80	85		A	A	A	A
81	86		E	E	E	E
82	87		D	D	D	D
83	88		L	V	V	V
84	89		G	G	G	G
85	90		L	V	V	V
86	91		Y	Y	Y	Y
87	92		Y	Y	Y	Y
88	93		C	C	C	C
89	94	CDR3	W	W	M	M
90	95		Q	Q	Q	Q
91	96		G	G	A	A
92	97		T	T	L	L
93	98		H	H	Q	Q
94	99		F	F	T	T
95	100		P	P	P	P
96	101		R	R	R	
97	102		T	T	T	

98	103	FR4	F	F	F
99	104		G	G	G
100	105		G	Q	Q
101	106		G	G	G
102	107		T	T	T
103	108		K	K	K
104	109		L	V	V
105	110		E	E	E
106	111		I	I	I
106A	112		K	K	K

Table 14. Key to Kabat Numbering for Heavy Chain

KAB #	#	TYPE	Mouse 3D6 VH	HUM 3D6 VH	KABID 045919	VH3-23 Germ-line	Comment
1	1	FR1	E	E	E	E	
2	2		V	V	V	V	
3	3		K	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		V	L	L	L	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		G	G	G	G	
10	10		G	G	G	G	
11	11		L	L	L	L	
12	12		V	V	V	V	
13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	
16	16		A	G	G	G	
17	17		S	S	S	S	
18	18		L	L	L	L	
19	19		K	R	R	R	
20	20		L	L	L	L	
21	21		S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	
23	23		A	A	A	A	
24	24		A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	
27	27		F	F	F	F	
28	28		T	T	T	T	
29	29		F	F	F	F	
30	30		S	S	S	S	
31	31	CDR1	N	N	S	S	
32	32		Y	Y	Y	Y	
33	33		G	G	A	A	
34	34		M	M	V	M	
35	35		S	S	S	S	

36	36	FR2	W	W	W	W	
37	37		V	V	V	V	
38	38		R	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	
40	40		N	A	A	A	Rare mouse, replace w/Hum
41	41		S	P	P	P	
42	42		D	G	G	G	Rare mouse, replace w/Hum
43	43		K	K	K	K	
44	44		R	G	G	G	
45	45		L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	
48	48		V	V	V	V	
49	49		A	A	S	S	CDR contact/veneer
50	50	CDR2	S	S	A	A	
51	51		I	I	I	I	
52	52		R	R	S	S	
52A	53		S	S	G	G	
53	54		G	G	S	S	
54	55		G	G	G	G	
55	56		G	G	G	G	
56	57		R	R	S	S	
57	58		T	T	T	T	
58	59		Y	Y	Y	Y	
59	60		Y	Y	Y	Y	
60	61		S	S	A	A	
61	62		D	D	D	D	
62	63		N	N	S	S	
63	64		V	V	V	V	
64	65		K	K	K	K	
65	66		G	G	G	G	

66	67	FR3	R	R	R	R	
67	68		F	F	F	F	
68	69		T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	
70	71		S	S	S	S	
71	72		R	R	R	R	
72	73		B	D	D	D	
73	74		N	N	N	N	
74	75		A	A	A	S	
75	76		K	K	K	K	
76	77		N	N	N	N	
77	78		T	S	S	T	
78	79		L	L	L	L	
79	80		Y	Y	Y	Y	
80	81		L	L	L	L	
81	82		Q	Q	Q	Q	
82	83		M	M	M	M	
82A	84		S	N	N	N	
82B	85		S	S	S	S	
82C	86		L	L	L	L	
83	87		K	R	R	R	
84	88		S	A	A	A	
85	89		E	E	E	E	
86	90		D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	
89	93		L	L	L	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	
91	95		Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	
93	97		V	V	A	A	Packing residue, use mouse
94	98		R	R	K	K	Canonical, use mouse
95	99	CDR3	Y	Y	D		
96	100		D	D	N		
97	101		H	H	Y		
98	102		Y	Y	D		
99	103		S	S	F		
100	104		G	G	W		
100A	105		S	S	S		
100B	106		S	S	G		
100C	107		-	-	T		
100D	108		-	-	F		
101	109		D	D	D		
102	110		Y	Y	Y		

103	111	FR4	W	W	W
104	112		G	G	G
105	113		Q	Q	Q
106	114		G	G	G
107	115		T	T	T
108	116		T	L	L
109	117		V	V	V
110	118		T	T	T
111	119		V	V	V
112	120		S	S	S
113	121		S	S	S

The humanized antibodies preferably exhibit a specific binding affinity for Aβ of at least 10^7, 10^8, 10^9 or 10^{10} M^{-1}. Usually the upper limit of binding affinity of the humanized antibodies for Aβ is within a factor of three, four or five of that of 3D6 (*i.e.*, ~10^9 M^{-1}). Often the lower limit of binding affinity is also within a factor of three, four or five of that of 3D6.

Assembly and Expression of Humanized 3D6 VH and VL, Version 1

Briefly, for each V region, 4 large single stranded overlapping oligonucleotides were synthesized. In addition, 4 short PCR primers were synthesized for each V region to further facilitate assembly of the particular V region. The DNA sequences of the oligonucleotides employed for this purpose are shown in Table 15.

Table 15: DNA oligonucleotides

DNA#	SIZE	Coding?	Sequence	comments
4060	136	Yes	tccgc aagct tgccg ccacc ATGGA CATGC GCGTG CCCGC CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC TCCGG CTACG TGGTG ATGAC CCAGT CCCCC CTGTC CCTGC CCGTG ACCCC CGGCG A (SEQ ID NO:17)	hum 3D6 VL-A
4061	131	No	CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT TCTGC AGCAG CCAGT TCAGG TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC CAGCA GGGAC TGGGA GGACT TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC TCGCC GGGGG TCACG GGCAG GGACA GGGGG G (SEQ ID NO:18)	hum 3D6 VL-B

4062	146	Yes	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AAGCC CGGCC AGTCC CCCCA GCGCC TGATC TACCT GGTGT CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC CGGCT CCGGC ACCGA CTTCA CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG GAGGC C (SEQ ID NO:19)	hum 3D6 VL-C
4063	142	No	aattc tagga tccac tcacg CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA GTAGT ACACG CCCAC GTCCT CGGCC TCCAC GCGGG AGATC TTCAG GGTGA AGTCG GTGCC GG (SEQ ID NO:20)	hum 3D6 VL-D
4064	16	No	CTGGG GGGAC TGGCC G (SEQ ID NO: 21)	hum 3D6 VL A+B back %A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.2[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.96
4065	22	Yes	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AA (SEQ ID NO:22)	hum 3D6 VL C+D forward % A+T = 45.45 [10]; % C+G = 54.55 [12] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 64.54
4066	138	Yes	acaga aagct tgccg ccacc ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG GCTTT TTCTT GTGGC TATTT TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG CGGCG GCCTG GTGCA GCCCG GCGGC TCCCT GCGCC TGT (SEQ ID NO:23)	hum 3D6 VH-A
4067	135	No	GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG CCACC CACTC CAGGC CCTTG CCGGG GGCCT GGCGC ACCCA GGACA TGCCG TAGTT GGAGA AGGTG AAGCC GGAGG CGGCG CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC GCCGG GCTGC ACCAG (SEQ ID NO:24)	hum 3D6 VH-B
4068	142	Yes	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT CCGCT CCGGC GGCGG CCGCA CCTAC TACTC CGACA ACGTG AAGGG CCGCT TCACC ATCTC CCGCG ACAAC GCCAA GAACT CCCTG TACCT GCAGA TGAAC TCCCT GCGCG CCGAG GACAC CG (SEQ ID NO:25)	hum 3D6 VH-C

4069	144	No	ctgca aggat ccact caccG GAGGA CACGG TCACC AGGGT GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG TAGCG CACGC AGTAG TACAG GGCGG TGTCC TCGGC GCGCA GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC AGGG (SEQ ID NO:26)	hum 3D6 VH-D
4070	16	No	GCCGC CGGAG CGGAT G (SEQ ID NO:27)	hum 3D6 VH A+B back % A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.25[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.96
4071	20	Yes	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT (SEQ ID NO:28)	hum 3D6 VH C+D forward % A+T = 35.00 [7]; % C+G = 65.00 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.55
4072	19	Yes	tcc gca agc ttg ccg cca c (SEQ ID NO:29)	Hum 3D6 VL A+B Forward % A+T = 31.58 [6]; % C+G = 68.42[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.64
4073	29	No	aat tct agg atc cac tca cgC TTG ATC TC (SEQ ID NO:30)	Hum 3D6 VL C+D Back % A+T = 55.17[16]; % C+G = 44.83 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.04
4074	23	Yes	aca gaa agc ttg ccg cca ccA TG (SEQ ID NO:31)	Hum 3D6 VH A+B Forward % A+T = 43.48 [10]; % C+G = 56.52 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.33
4075	22	No	ctg caa gga tcc act cac cGG A (SEQ ID NO:32)	Hum 3D6 VH C+D Back % A+T = 40.91 [9]; % C+G = 59.09[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.40

The humanized light chain was assembled using PCR. DNA sequence analysis of greater than two dozen clones revealed scattered point mutations and deletions throughout the VL region with respect to the expected sequence. Analysis of the sequences indicated that clone 2.3 was amenable to repair of 2 closely spaced single nucleotide deletions in the amino-terminal region. Hence site directed mutagenesis was performed on clone pCRShum3D6v12.3 using oligonucleotides to introduce the 2 deleted nucleotides, and repair of the point mutations was confirmed by DNA sequence analysis, and the VL insert was cloned into the light chain expression vector pCMV-cK.

Assembly of humanized VH using PCR-based methods resulted in clones with gross deletions in the 5' half of the sequence. Further efforts to optimize the PCR conditions met with partial success. The clones assembled via optimized PCR conditions still had 10-20 nt deletions in the region mapping to the overlap of the A+B fragments. Consequently, an alternate strategy was employed for VH assembly utilizing DNA polymerase (T4, Klenow, and Sequenase) mediated overlap extension, followed by T4 DNA ligase to covalently join the overlapping ends. DNA sequence analysis of a subset of the clones resulting from VH assembly using the latter approach revealed scattered point mutations and deletions among the clones. Analysis of over two dozen clones revealed essentially the same pattern as illustrated for the clones. The similar results observed following first pass assembly of VH and VL clones suggests the DNA sequence errors observed resulted from automated synthesizer errors during the synthesis of the long DNAs employed for the assembly.

Humanized VH clone 2.7 was selected for site-directed mutagenesis-mediated repair of the 3 nucleotide deletions it was observed to contain.

Example XIII: Characterization of Humanized 3D6v2 Antibody

A second version of humanized 3D6 was created having each of the substitutions indicated for version 1, except for the D→ Y substitution at residue 1. Substitution at this residue was performed in version 1 because the residue was identified as a CDR interacting residue. However, substitution deleted a residue which was rare for human immunoglobulins at that position. Hence, a version was created without the substitution. Moreover, non-germline residues in the heavy chain framework regions were substituted with germline residues, namely, H74 = S, H77 = T

and H89 = V. Kabat numbering for the version 2 light and heavy chains, is the same as that depicted in Tables 13 and 14, respectively, except that residue 1 of the version 2 light chain is asp (D), residue 74 of the heavy chain is ser (S), residue 77 of the heavy chain is thr (T) and residue 89 of the heavy chain is val (V). The nucleotide sequence of humanized 3D6 version 1 light and heavy chains are set forth as SEQ ID NOs: 34 and 36, respectively. The nucleotide sequence of humanized 3D6 version 2 light and heavy chains are set forth as SEQ ID NOs: 35 and 37, respectively.

Example IX: Functional Testing of Humanized 3D6 Antibodies

Binding of humanized 3D6v1 to aggregated Aβ. Functional testing of humanized 3D6v1 was conducted using conditioned media from transiently transfected COS cells. The cells were transfected with fully chimeric antibody, a mixture of either chimeric heavy chain + humanized light chain, or chimeric light chain + humanized heavy chain, and lastly, fully humanized antibody. The conditioned media was tested for binding to aggregated Aβ1-42 by ELISA assay. The humanized antibody showed good activity within experimental error, and displayed binding properties indistinguishable from the chimeric 3D6 reference sample. The results are shown in Table 16.

Table 16:

ng/ml	Chimeric	hu VH/ ChVL	ChVH/ HuVL	Hu VH/ HuVL
690			0.867	
600				0.895
260	0.83			
230			0.774	
200				0.81
190		0.811		
87	0.675			
77			0.594	
67				0.689
63		0.648		
29	0.45			
25			0.381	
22				0.496
21		0.438		
9.6	0.251			
8.5			0.198	
7.4				0.278
7		0.232		
3.2	0.129			
2.3		0.124		

To compare the binding affinities of humanized 3D6v1 and 3D6v2 antibodies, ELISA analysis was performed using aggregated Aβ as the antigen. The results show that both 3D6v1 (H1L1) and 3D6v2 (H2L2) have nearly identical Aβ binding properties (Figure 5).

Replacement NET (rNET) analysis of h3D6v2. The rNET epitope map assay provides information about the contribution of individual residues within the epitope to the overall binding activity of the antibody. rNET analysis uses synthesized systematic single substituted peptide analogs. Binding of an antibody being tested is determined against native peptide (native antigen) and against 19 alternative "single substituted" peptides, each peptide being substituted at a first position with one of 19 non-native amino acids for that position. A profile is generated reflecting the effect of substitution at that position with the various non-native residues. Profiles are likewise generated at successive positions along the antigenic peptide. The combined profile, or epitope map, (reflecting substitution at each position with all 19 non-native residues) can then be compared to a map similarly generated for a second antibody. Substantially similar or identical maps indicate that antibodies being compared have the same or similar epitope specificity.

This analysis was performed for 3D6 and humanized 3D6, version 2. Antibodies were tested for binding against the native Aβ peptide DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:33). Residues 1-8 were systematically substituted with each of the 19 non-native residues for that position. Maps were generated accordingly for 3D6 and h3D6v2. The results are presented in tabular form in Table 17.

Table 17: Aβ: replacement Net Epitope (rNET) mapping of wt3D6 and humanized 3D6

Substitution	Wildtype 3D6 [OD]	Humanized 3D6 [OD]	Substitution	Wildtype 3D6 [OD]	Humanized 3D6 [OD]
Residue 1 = A	0.464	0.643	Residue 5 = A	0.275	0.435
C	0.450	0.628	C	0.359	0.635
D	0.577	0.692	D	0.080	0.163
E	0.576	0.700	E	0.115	0.187
F	0.034	0.062	F	0.439	0.569
G	0.569	0.738	G	0.485	0.679
H	0.054	0.117	H	0.577	0.680
I	0.048	0.118	I	0.510	0.671
K	0.033	0.057	K	0.573	0.693
L	0.073	0.148	L	0.517	0.691
M	0.039	0.072	M	0.418	0.611
N	0.587	0.757	N	0.476	0.655
P	0.069	0.144	P	0.093	0.198
Q	0.441	0.689	Q	0.388	0.565
R	0.056	0.155	R	0.613	0.702
S	0.569	0.762	S	0.487	0.633
T	0.450	0.702	T	0.530	0.639
V	0.057	0.190	V	0.493	0.562
W	0.031	0.070	W	0.393	0.461
Y	0.341	0.498	Y	0.278	0.230
Residue 2 = A	0.548	0.698	Residue 6 = A	0.587	0.707
C	0.553	0.694	C	0.585	0.703
D	0.119	0.222	D	0.584	0.701
E	0.563	0.702	E	0.579	0.702
F	0.577	0.717	F	0.586	0.704
G	0.527	0.720	G	0.592	0.709
H	0.534	0.741	H	0.596	0.688
I	0.522	0.722	I	0.602	0.708
K	0.548	0.722	K	0.585	0.691
L	0.482	0.705	L	0.584	0.688
M	0.535	0.705	M	0.583	0.687
N	0.525	0.735	N	0.580	0.686
P	0.445	0.707	P	0.587	0.705
Q	0.567	0.756	Q	0.570	0.695
R	0.562	0.719	R	0.576	0.686

	S	0.587	0.705	S	0.573	0.689
	T	0.552	0.712	T	0.573	0.700
	V	0.550	0.702	V	0.588	0.715
	W	0.553	0.701	W	0.576	0.696
	Y	0.547	0.704	Y	0.595	0.708
Residue 3 =	A	0.038	0.061	Residue 7 = A	0.580	0.688
	C	0.222	0.410	C	0.559	0.676
	D	0.019	0.027	D	0.573	0.681
	E	0.542	0.689	E	0.565	0.677
	F	0.034	0.060	F	0.546	0.668
	G	0.016	0.019	G	0.562	0.679
	H	0.016	0.020	H	0.557	0.675
	I	0.019	0.024	I	0.552	0.681
	K	0.053	0.090	K	0.565	0.685
	L	0.019	0.026	L	0.566	0.701
	M	0.019	0.027	M	0.562	0.697
	N	0.024	0.032	N	0.573	0.688
	P	0.017	0.020	P	0.582	0.678
	Q	0.153	0.406	Q	0.563	0.679
	R	0.015	0.023	R	0.551	0.677
	S	0.016	0.021	S	0.563	0.674
	T	0.015	0.019	T	0.560	0.685
	V	0.016	0.021	V	0.563	0.687
	W	0.149	0.304	W	0.547	0.685
	Y	0.016	0.020	Y	0.560	0.682
Residue 4 =	A	0.016	0.020	Residue 8 = A	0.573	0.687
	C	0.020	0.023	C	0.583	0.700
	D	0.017	0.020	D	0.586	0.697
	E	0.016	0.021	E	0.601	0.701
	F	0.557	0.703	F	0.586	0.687
	G	0.016	0.020	G	0.569	0.681
	H	0.470	0.723	H	0.559	0.683
	I	0.119	0.360	I	0.568	0.686
	K	0.015	0.018	K	0.557	0.698
	L	0.559	0.716	L	0.570	0.686
	M	0.549	0.725	M	0.571	0.693
	N	0.085	0.089	N	0.573	0.700
	P	0.030	0.056	P	0.574	0.694
	Q	0.065	0.110	Q	0.590	0.703
	R	0.016	0.019	R	0.589	0.699
	S	0.026	0.031	S	0.599	0.719
	T	0.016	0.021	T	0.586	0.689
	V	0.213	0.494	V	0.578	0.688
	W	0.291	0.568	W	0.567	0.687
	Y	0.529	0.730	Y	0.574	0.680

Notably, the profiles are virtually identical for 3D6 and h3D6v2 when one looks at the substitutions at each position (*i.e.*, the values fluctuate in an identical

manner when comparing the data in column 1 (3D6) versus column 2 (h3D6v2). These data demonstrate that the specificity of h3D6v2 is preserved, as the h3D6v2 rNET epitope map is virtually identical to m3D6 using both Aβ residues 1-4 and 5-8.

Immunohistochemistry on PDAPP brain sections demonstrates specificity of h3D6v1 antibody. Humanized 3D6v1 antibody recognized Aβ in cryostat prepared brain sections from PDAPP mice. Humanized 3D6v1 and PK1614 both bound to PDAPP plaques in the same dose response fashion, as measured by the amount of fluorescence (quantitated in pixels) per slide versus the amount of antibody used to stain the tissue (Figure 6). Identical anti-human secondary antibodies were used in this experiment. Sectioning, staining, and image procedures were previously described. In identical experiments, image analysis of h3D6v2 staining on PDAPP and AD brain sections revealed that h3D6v2 recognizes Aβ plaques in a similar manner to 3D6v1 (*e.g.*, highly decorated plaques).

Competitive binding analysis of h3D6. The ability of h3D6 antibodies v1 and v2 to compete with murine 3D6 was measured by ELISA using a biotinylated 3D6 antibody. Competitive binding analysis revealed that h3D6v1, h3D6v2, and chimeric PK1614 can all compete with m3D6 to bind Aβ (Figure 7). h3D6v1 and h3D6v2 were identical in their ability to compete with 3D6 to Aβ. The 10D5 antibody was used as a negative control, as it has a different binding epitope than 3D6. BIAcore analysis also revealed a high affinity of h3D6v1 and h3D6v2 for Aβ (Table 18).

Table 18: Affinity Measurements of Aβ Antibodies Using BIAcore Technology

Antibody	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	Kd (nM)
Mu 3D6	4.06E+05	3.57E-04	0.88
Chimeric 3D6	4.58E+05	3.86E-04	0.84
Hu 3D6v1	1.85E+05	3.82E-04	2.06
Hu 3D6v2	1.70E+05	3.78E-04	2.24

In comparison to 3D6, which has a Kd of 0.88 nM, both h3D6v1 and h3D6v2 had about a 2 to 3 fold less binding affinity, measured at 2.06 nM and 2.24 nM for h3D6v1 and h3D6v2, respectively. The ELISA competitive binding assay revealed

an approximate 6-fold less binding affinity for h3D6v1 and h3D6v2. Typically humanized antibodies lose about 3-4 fold in binding affinity in comparison to their murine counterparts. Therefore, a loss of about 3 fold (average of ELISA and BIAcore results) for h3D6v1 and h3D6v2 is within the accepted range.

Ex vivo assay using h3D6v2 antibody. The ability of h3D6v2 to stimulate microglial cells was tested through an *ex vivo* phagocytosis assay (Figure 8). h3D6v2 was as effective as chimeric 3D6 at inducing phagocytosis of Aβ aggregates from PDAPP mouse brain tissue. IgG was used as a negative control in this experiment because it is incapable of binding Aβ and therefore cannot induce phagocytosis.

In vivo brain localization of h3D6. ^{125}I labeled h3D6v2, m3D6, and antibody DAE13 were each IV-injected into 14 individual PDAPP mice in separate experiments. Mice were sacrificed after Day 7 and perfused for further analysis. Their brain regions were dissected and measured for ^{125}I activity in specific brain regions. Radiolabel activity in the brain was compared with activity in serum samples. Results are set forth in Tables 19 and 20, for serum and brain regions, respectively.

Table 19

m3D6	DAE13	Hu3D6
30389.1	17463.9	40963.8
12171	13200.6	24202.2
3418.2	36284.7	12472.4
18678.9	421.3	33851.8
27241	19702	27187.3
26398.8	24855.8	29016.9
27924.8	29287.4	33830.7
12006.4	12733.1	26734.9
29487.8	27722.5	30144.5
25498.6	30460.7	35126.9
9652	23320.1	28414.8
24599.3	7119.1	16956.1
29240	28093.5	18190.7
11922.7	24659.7	25571.4
17443.1	26748.9	

Table 20

m3D6			DAE13			Hu3D6 (H2L2)		
cere	cort	hipp	cere	cort	hipp	cere	cort	hipp
1991.9	1201.1	4024	1277.5	2522.9	5711.9	2424.6	3759.4	11622
238.9	746.1	2523	502.5	2123.5	6965.8	1509.8	2274.9	7018.2
645.9	603	1241.1	2325	3528.2	7801.6	500	2265.9	5316.3
1000	2508.2	4644.2	232.7	849.8	1891.9	2736.2	5703.7	10395.5
1266.9	3737.9	7975.8	891.6	2621	8245.2	1192.2	3188	10170
1422	2398.7	7731.1	1102.6	2087.5	7292.3	2269.4	3481.4	9821.6
1700.4	2154.4	7124.1	1650.6	3488.4	10284.6	1526.7	3028	8331.3
542.5	612.4	2456.8	712.9	2316.5	6643.3	1538.1	4194.1	11244.8
1309	3010.5	8693.5	1172.9	1953.6	7363	1245.7	1699.4	6831.2
1372.2	997.5	2425.4	1067.9	3897.2	12280.7	2708.8	2789	7887.4
778.6	1291.9	5654.4	1952.2	2120.7	6412.7	2251.3	3897.5	11121.5
1199.3	1683.4	4887.3	1005.2	1852.5	5121.4	1529.8	1772.2	7986.9
1021.8	3234.5	8036.2	961.5	3382.9	8473.1	644.1	1663.4	6056.5
742.1	1056.7	3405.2	852.3	1943.2	6717.4	1516.4	1620.6	9888
1273.7	1320.8	4262.6	997.5	3085.7	10213.1			

The data show that h3D6v2 localized to the brain, and was particularly concentrated in the hippocampal region where Aβ is known to aggregate. Brain counts for m3D6 and DAE13 were comparable to h3D6v2. All three antibodies were able to cross the blood barrier as demonstrated by Aβ plaque binding *in vivo*.

Example X. Cloning and Sequencing of the Mouse 10D5 Variable Regions

Cloning and Sequence Analysis of 10D5 VH. The VH and VL regions of 10D5 from hybridoma cells were cloned by RT-PCR using 5' RACE procedures. The nucleotide sequence (SEQ ID NO:13) and deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:14) derived from two independent cDNA clones encoding the presumed 10D5 VL domain, are set forth in Table 21 and Figure 9. The nucleotide sequence (SEQ ID NO:15) and deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:16) derived from two independent cDNA clones encoding the presumed 10D5 VH domain, are set forth in Table 22 and Figure 10. The 10D5 VL and VH sequences meet the criteria for functional V regions in so far as they contain a contiguous ORF from the initiator methionine to the C-region, and share conserved residues characteristic of immunoglobulin V region genes.

Table 21: Mouse 10D5 VL DNA sequence

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGA
TGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT
TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGA
TCAAGAAAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTT
CCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEQ ID NO:13)

*Leader peptide underlined

Table 22: Mouse 10D5 VH DNA sequence.

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA
GGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA
CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGAGTGAGCTGGATTCGT
CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGG
TATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTCGA
AGGCCCATTACTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:15)

*Leader peptide underlined.

Example XI. Prevention and Treatment of Human Subjects

A single-dose phase I trial is performed to determine safety in humans. A therapeutic agent is administered in increasing dosages to different patients starting from about 0.01 the level of presumed efficacy, and increasing by a factor of three until a level of about 10 times the effective mouse dosage is reached.

A phase II trial is performed to determine therapeutic efficacy. Patients with early to mid Alzheimer's Disease defined using Alzheimer's disease and Related Disorders Association (ADRDA) criteria for probable AD are selected. Suitable patients score in the 12-26 range on the Mini-Mental State Exam (MMSE). Other selection criteria are that patients are likely to survive the duration of the study and lack

complicating issues such as use of concomitant medications that may interfere. Baseline evaluations of patient function are made using classic psychometric measures, such as the MMSE, and the ADAS, which is a comprehensive scale for evaluating patients with Alzheimer's Disease status and function. These psychometric scales provide a measure of progression of the Alzheimer's condition. Suitable qualitative life scales can also be used to monitor treatment. Disease progression can also be monitored by MRI. Blood profiles of patients can also be monitored including assays of immunogen-specific antibodies and T-cells responses.

Following baseline measures, patients begin receiving treatment. They are randomized and treated with either therapeutic agent or placebo in a blinded fashion. Patients are monitored at least every six months. Efficacy is determined by a significant reduction in progression of a treatment group relative to a placebo group.

A second phase II trial is performed to evaluate conversion of patients from non-Alzheimer's Disease early memory loss, sometimes referred to as age-associated memory impairment (AAMI) or mild cognitive impairment (MCI), to probable Alzheimer's disease as defined as by ADRDA criteria. Patients with high risk for conversion to Alzheimer's Disease are selected from a non-clinical population by screening reference populations for early signs of memory loss or other difficulties associated with pre-Alzheimer's symptomatology, a family history of Alzheimer's Disease, genetic risk factors, age, sex, and other features found to predict high-risk for Alzheimer's Disease. Baseline scores on suitable metrics including the MMSE and the ADAS together with other metrics designed to evaluate a more normal population are collected. These patient populations are divided into suitable groups with placebo comparison against dosing alternatives with the agent. These patient populations are followed at intervals of about six months, and the endpoint for each patient is whether or not he or she converts to probable Alzheimer's Disease as defined by ADRDA criteria at the end of the observation.

General Materials and Methods

A. Preparation of Polyclonal and Monoclonal Aβ Antibodies

The anti-Aβ polyclonal antibody was prepared from blood collected from two groups of animals. The first group consisted of 100 female Swiss Webster mice, 6

to 8 weeks of age. They were immunized on days 0, 15, and 29 with 100 μg of AN1792 combined with CFA/IFA. A fourth injection was given on day 36 with one-half the dose of AN1792. Animals were exsanguinated upon sacrifice at day 42, serum was prepared and the sera were pooled to create a total of 64 ml. The second group consisted of 24 female mice isogenic with the PDAPP mice but nontransgenic for the human APP gene, 6 to 9 weeks of age. They were immunized on days 0, 14, 28 and 56 with 100 μg of AN1792 combined with CFA/IFA. These animals were also exsanguinated upon sacrifice at day 63, serum was prepared and pooled for a total of 14 ml. The two lots of sera were pooled. The antibody fraction was purified using two sequential rounds of precipitation with 50% saturated ammonium sulfate. The final precipitate was dialyzed against PBS and tested for endotoxin. The level of endotoxin was less than 1 EU/mg.

The anti-Aβ monoclonal antibodies were prepared from ascites fluid. The fluid was first delipidated by the addition of concentrated sodium dextran sulfate to ice-cold ascites fluid by stirring on ice to a reach a final concentration of 0.238%. Concentrated $CaCl_2$ was then added with stirring to reach a final concentration of 64mM. This solution was centrifuged at 10,000 x g and the pellet was discarded. The supernatant was stirred on ice with an equal volume of saturated ammonium sulfate added dropwise. The solution was centrifuged again at 10,000 x g and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended and dialyzed against 20 mM Tris-HCl , 0.4 M NaCl, pH 7.5. This fraction was applied to a Pharmacia FPLC Sepharose Q Column and eluted with a reverse gradient from 0.4 M to 0.275 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5.

The antibody peak was identified by absorbance at 280 nm and appropriate fractions were pooled. The purified antibody preparation was characterized by measuring the protein concentration using the BCA method and the purity using SDS-PAGE. The pool was also tested for endotoxin. The level of endotoxin was less than 1 EU/mg. titers, titers less than 100 were arbitrarily assigned a titer value of 25.

B. Measurement of Antibody Titers

Mice were bled by making a small nick in the tail vein and collecting about 200 μl of blood into a microfuge tube. Guinea pigs were bled by first shaving the back hock area and then using an 18 gauge needle to nick the metatarsal vein and

collecting the blood into microfuge tubes. Blood was allowed to clot for one hr at room temperature (RT), vortexed, then centrifuged at 14,000 x g for 10 min to separate the clot from the serum. Serum was then transferred to a clean microfuge tube and stored at 4°C until titered.

Antibody titers were measured by ELISA. 96-well microtiter plates (Costar EIA plates) were coated with 100 µl of a solution containing either 10 µg/ml either Aβ42 or SAPP or other antigens as noted in each of the individual reports in Well Coating Buffer (0.1 M sodium phosphate, pH 8.5, 0.1% sodium azide) and held overnight at RT. The wells were aspirated and sera were added to the wells starting at a 1/100 dilution in Specimen Diluent (0.014 M sodium phosphate, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.6% bovine serum albumin, 0.05% thimerosal). Seven serial dilutions of the samples were made directly in the plates in three-fold steps to reach a final dilution of 1/218,700. The dilutions were incubated in the coated-plate wells for one hr at RT. The plates were then washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20. The second antibody, a goat anti-mouse Ig conjugated to horseradish peroxidase (obtained from Boehringer Mannheim), was added to the wells as 100 µl of a 1/3000 dilution in Specimen Diluent and incubated for one hr at RT. Plates were again washed four times in PBS, Tween 20. To develop the chromogen, 100 µl of Slow TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine obtained from Pierce Chemicals) was added to each well and incubated for 15 min at RT. The reaction was stopped by the addition of 25 µl of 2 M H_2SO_4. The color intensity was then read on a Molecular Devices Vmax at (450 nm - 650 nm).

Titers were defined as the reciprocal of the dilution of serum giving one half the maximum OD. Maximal OD was generally taken from an initial 1/100 dilution, except in cases with very high titers, in which case a higher initial dilution was necessary to establish the maximal OD. If the 50% point fell between two dilutions, a linear extrapolation was made to calculate the final titer. To calculate geometric mean antibody titers, titers less than 100 were arbitrarily assigned a titer value of 25.

C. Brain Tissue Preparation

After euthanasia, the brains were removed and one hemisphere was prepared for immunohistochemical analysis, while three brain regions (hippocampus, cortex and cerebellum) were dissected from the other hemisphere and used to measure

the concentration of various Aβ proteins and APP forms using specific ELISAs (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

Tissues destined for ELISAs were homogenized in 10 volumes of ice-cold guanidine buffer (5.0 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The homogenates were mixed by gentle agitation using an Adams Nutator (Fisher) for three to four hr at RT, then stored at -20°C prior to quantitation of Aβ and APP. Previous experiments had shown that the analytes were stable under this storage condition, and that synthetic Aβ protein (Bachem) could be quantitatively recovered when spiked into homogenates of control brain tissue from mouse littermates (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

D. Measurement of Aβ Levels

The brain homogenates were diluted 1:10 with ice cold Casein Diluent (0.25% casein, PBS, 0.05% sodium azide, 20 μg/ml aprotinin, 5 mM EDTA pH 8.0, 10 μg/ml leupeptin) and then centrifuged at 16,000 x g for 20 min at 4° C. The synthetic Aβ protein standards (1-42 amino acids) and the APP standards were prepared to include 0.5 M guanidine and 0.1% bovine serum albumin (BSA) in the final composition. The "total" Aβ sandwich ELISA utilizes monoclonal antibody monoclonal antibody 266, specific for amino acids 13-28 of Aβ (Seubert *et al.*, *supra*), as the capture antibody, and biotinylated monoclonal antibody 3D6, specific for amino acids 1-5 of Aβ (Johnson-Wood *et al.*, *supra*), as the reporter antibody. The 3D6 monoclonal antibody does not recognize secreted APP or full-length APP, but detects only Aβ species with an amino-terminal aspartic acid. This assay has a lower limit of sensitivity of ~50 ng/ml (11nM) and shows no cross-reactivity to the endogenous murine Aβ protein at concentrations up to 1 ng/ml (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

The Aβ1-42 specific sandwich ELISA employs mAβ 21F12, specific for amino acids 33-42 of Aβ (Johnson-Wood, *et al. supra*), as the capture antibody. Biotinylated mAβ 3D6 is also the reporter antibody in this assay which has a lower limit of sensitivity of about 125 μg/ml (28 μM, Johnson-Wood *et al.*, *supra*). For the Aβ ELISAs, 100 μl of either mAβ 266 (at 10 μg/ml) or mAβ 21F12 at (5 μg/ml) was coated into the wells of 96-well immunoassay plates (Costar) by overnight incubation at

RT. The solution was removed by aspiration and the wells were blocked by the addition of 200 µl of 0.25% human serum albumin in PBS buffer for at least 1 hr at RT. Blocking solution was removed and the plates were stored desiccated at 4°C until used. The plates were rehydrated with Wash Buffer [Tris-buffered saline (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5), plus 0.05% Tween 20] prior to use. The samples and standards were added in triplicate aliquots of 100 µl per well and then incubated overnight at 4° C. The plates were washed at least three times with Wash Buffer between each step of the assay. The biotinylated mAβ 3D6, diluted to 0.5 µg/ml in Casein Assay Buffer (0.25% casein, PBS, 0.05% Tween 20, pH 7.4), was added and incubated in the wells for 1 hr at RT. An avidin-horseradish peroxidase conjugate, (Avidin-HRP obtained from Vector, Burlingame, CA), diluted 1:4000 in Casein Assay Buffer, was added to the wells for 1 hr at RT. The colorimetric substrate, Slow TMB-ELISA (Pierce), was added and allowed to react for 15 minutes at RT, after which the enzymatic reaction was stopped by the addition of 25 µl 2 N H2SO4. The reaction product was quantified using a Molecular Devices Vmax measuring the difference in absorbance at 450 nm and 650 nm.

E. Measurement of APP Levels

Two different APP assays were utilized. The first, designated APP-α/FL, recognizes both APP-alpha (α) and full-length (FL) forms of APP. The second assay is specific for APP-α. The APP-α /FL assay recognizes secreted APP including the first 12 amino acids of Aβ. Since the reporter antibody (2H3) is not specific to the α-clip-site, occurring between amino acids 612-613 of APP^{695} (Esch *et al.*, Science 248:1122-1124 (1990)); this assay also recognizes full length APP (APP-FL). Preliminary experiments using immobilized APP antibodies to the cytoplasmic tail of APP-FL to deplete brain homogenates of APP-FL suggest that approximately 30-40% of the APP-α /FL APP is FL (data not shown). The capture antibody for both the APP-α/FL and APP-α assays is mAb 8E5, raised against amino acids 444 to 592 of the APP^{695} form (Games *et al.*, *supra*). The reporter mAb for the APP-α/FL assay is mAb 2H3, specific for amino acids 597-608 of APP^{695} (Johnson-Wood *et al.*, *supra*) and the reporter antibody for the APP-α assay is a biotinylated derivative of mAb 16H9, raised to amino acids 605

to 611 of APP. The lower limit of sensitivity of the APP-αFL assay is about 11 ng/ml (150 pM) (Johnson-Wood *et al.*) and that of the APP-α specific assay is 22 ng/ml (0.3 nM). For both APP assays, mAb 8E5 was coated onto the wells of 96-well EIA plates as described above for mAb 266. Purified, recombinant secreted APP-α was used as the reference standard for the APP-α assay and the APP-α/FL assay (Esch *et al.*, *supra*). The brain homogenate samples in 5 M guanidine were diluted 1:10 in ELISA Specimen Diluent (0.014 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.6% bovine serum albumin, 0.05% thimerosal, 0.5 M NaCl, 0.1% NP40). They were then diluted 1:4 in Specimen Diluent containing 0.5 M guanidine. Diluted homogenates were then centrifuged at 16,000 x g for 15 seconds at RT. The APP standards and samples were added to the plate in duplicate aliquots and incubated for 1.5 hr at RT. The biotinylated reporter antibody 2H3 or 16H9 was incubated with samples for 1 hr at RT. Streptavidin-alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim), diluted 1:1000 in specimen diluent, was incubated in the wells for 1 hr at RT. The fluorescent substrate 4-methyl-umbellipheryl-phosphate was added for a 30-min RT incubation and the plates were read on a Cytofluor tm 2350 fluorimeter (Millipore) at 365 nm excitation and 450 nm emission.

F. Immunohistochemistry

Brains were fixed for three days at 40C in 4% paraformaldehyde in PBS and then stored from one to seven days at 4°C in 1% paraformaldehyde, PBS until sectioned. Forty-micron-thick coronal sections were cut on a vibratome at RT and stored in cryoprotectant (30% glycerol, 30% ethylene glycol in phosphate buffer) at -20°C prior to immunohistochemical processing. For each brain, six sections at the level of the dorsal hippocampus, each separated by consecutive 240 μm intervals, were incubated overnight with one of the following antibodies: (1) a biotinylated anti-Aβ (mAb, 3D6, specific for human Aβ) diluted to a concentration of 2 μg/ml in PBS and 1% horse serum; or (2) a biotinylated mAb specific for human APP, 8E5, diluted to a concentration of 3 μg/ml in PBS and 1.0% horse serum; or (3) a mAb specific for glial fibrillary acidic protein (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluted 1:500 with 0.25% Triton X-100 and 1% horse serum, in Tris-buffered saline, pH 7.4 (TBS); or (4) a mAb specific for CD11b, MAC-1 antigen, (Chemicon International) diluted 1:100 with 0.25% Triton X-100 and 1% rabbit serum in TBS; or (5) a mAb specific for MHC II antigen,

(Pharmingen) diluted 1:100 with 0.25% Triton X-100 and 1% rabbit serum in TBS; or (6) a rat mAb specific for CD 43 (Pharmingen) diluted 1:100 with 1% rabbit serum in PBS or (7) a rat mAb specific for CD 45RA (Pharmingen) diluted 1:100 with 1% rabbit serum in PBS; or (8) a rat monoclonal Aβ specific for CD 45RB (Pharmingen) diluted 1:100 with 1% rabbit serum in PBS; or (9) a rat monoclonal Aβ specific for CD 45 (Pharmingen) diluted 1:100 with 1% rabbit serum in PBS; or (10) a biotinylated polyclonal hamster Aβ specific for CD3e (Pharmingen) diluted 1:100 with 1% rabbit serum in PBS or (11) a rat mAb specific for CD3 (Serotec) diluted 1:200 with 1% rabbit serum in PBS; or with (12) a solution of PBS lacking a primary antibody containing 1% normal horse serum.

Sections reacted with antibody solutions listed in 1,2 and 6-12 above were pretreated with 1.0% Triton X-100, 0.4% hydrogen peroxide in PBS for 20 min at RT to block endogenous peroxidase. They were next incubated overnight at 4°C with primary antibody. Sections reacted with 3D6 or 8E5 or CD3e mAbs were then reacted for one hr at RT with a horseradish peroxidase-avidin-biotin-complex with kit components "A" and "B" diluted 1:75 in PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Sections reacted with antibodies specific for CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 and the PBS solution devoid of primary antibody were incubated for 1 hour at RT with biotinylated anti-rat IgG (Vector) diluted 1:75 in PBS or biotinylated anti-mouse IgG (Vector) diluted 1:75 in PBS, respectively. Sections were then reacted for one hr at RT with a horseradish peroxidase-avidin-biotin-complex with kit components "A" and "B" diluted 1:75 in PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Sections were developed in 0.01% hydrogen peroxide, 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) at RT. Sections destined for incubation with the GFAP-, MAC-1- AND MHC II-specific antibodies were pretreated with 0.6% hydrogen peroxide at RT to block endogenous peroxidase then incubated overnight with the primary antibody at 4°C. Sections reacted with the GFAP antibody were incubated for 1 hr at RT with biotinylated anti-mouse IgG made in horse (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluted 1:200 with TBS. The sections were next reacted for one hr with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluted 1:1000 with TBS. Sections incubated with the MAC-1-or MHC II-

specific monoclonal antibody as the primary antibody were subsequently reacted for 1 hr at RT with biotinylated anti-rat IgG made in rabbit diluted 1:200 with TBS, followed by incubation for one hr with avidin-biotin-peroxidase complex diluted 1:1000 with TBS. Sections incubated with GFAP-, MAC-1- and MHC II-specific antibodies were then visualized by treatment at RT with 0.05% DAB, 0.01% hydrogen peroxide, 0.04% nickel chloride, TBS for 4 and 11 min, respectively.

Immunolabeled sections were mounted on glass slides (VWR, Superfrost slides), air dried overnight, dipped in Propar (Anatech) and overlaid with coverslips using Permount (Fisher) as the mounting medium.

To counterstain Aβ plaques, a subset of the GFAP-positive sections were mounted on Superfrost slides and incubated in aqueous 1% Thioflavin S (Sigma) for 7 min following immunohistochemical processing. Sections were then dehydrated and cleared in Propar, then overlaid with coverslips mounted with Permount.

G. Image Analysis

A Videometric 150 Image Analysis System (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) linked to a Nikon Microphot-FX microscope through a CCD video camera and a Sony Trinitron monitor was used for quantification of the immunoreactive slides. The image of the section was stored in a video buffer and a color-and saturation-based threshold was determined to select and calculate the total pixel area occupied by the immunolabeled structures. For each section, the hippocampus was manually outlined and the total pixel area occupied by the hippocampus was calculated. The percent amyloid burden was measured as: (the fraction of the hippocampal area containing Aβ deposits immunoreactive with mAb 3D6) x 100. Similarly, the percent neuritic burden was measured as: (the fraction of the hippocampal area containing dystrophic neurites reactive with monoclonal antibody 8E5) x100. The C-Imaging System (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) operating the Simple 32 Software Application program was linked to a Nikon Microphot-FX microscope through an Optronics camera and used to quantitate the percentage of the retrospenial cortex occupied by GFAP-positive astrocytes and MAC-1-and MHC II-positive microglia. The image of the immunoreacted section was stored in a video buffer and a monochrome-based threshold was determined to select and calculate the total pixel area occupied by immunolabeled

cells. For each section, the retrosplenial cortex (RSC) was manually outlined and the total pixel area occupied by the RSC was calculated. The percent astrocytosis was defined as: (the fraction of RSC occupied by GFAP-reactive astrocytes) X 100. Similarly, percent microgliosis was defined as: (the fraction of the RSC occupied by MAC-1- or MHC II-reactive microglia) X 100. For all image analyses, six sections at the level of the dorsal hippocampus, each separated by consecutive 240 μm intervals, were quantitated for each animal. In all cases, the treatment status of the animals was unknown to the observer.

Although the foregoing invention has been described in detail for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain modifications may be practiced within the scope of the appended claims. All publications and patent documents cited herein, as well as text appearing in the figures and sequence listing, are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each were so individually denoted.

From the foregoing it will be apparent that the invention provides for a number of uses. For example, the invention provides for the use of any of the antibodies to Aβ described above in the treatment, prophylaxis or diagnosis of amyloidogenic disease, or in the manufacture of a medicament or diagnostic composition for use in the same.

We claim:

1. A humanized immunoglobulin light chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin light chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light chain variable region sequence, wherein the framework residue is selected from the group consisting of:

(a) a residue that non-covalently binds antigen directly;

(b) a residue adjacent to a CDR;

(c) a CDR-interacting residue; and

(d) a residue participating in the VL-VH interface.

2. A humanized immunoglobulin heavy chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 heavy chain variable region sequence, wherein the framework residue is selected from the group consisting of:

(a) a residue that non-covalently binds antigen directly;

(b) a residue adjacent to a CDR;

(c) a CDR-interacting residue; and

(d) a residue participating in the VL-VH interface.

3. The light chain of claim 1, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 3D6 light chain based on the solved structure of 1CR9.

4. The light chain of claim 1, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 3D6 light chain based on the solved structure of 1NLD.

5. The heavy chain of claim 2, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 3D6 heavy chain based on the solved structure of 1OPG.

6. A humanized immunoglobulin light chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin light chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light chain variable region sequence, wherein the framework residue is a residue capable of affecting light chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the 3D6 immunoglobulin light chain variable region.

7. A humanized immunoglobulin heavy chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4, and (ii) variable framework region from a human acceptor immunoglobulin heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 heavy chain variable region sequence, wherein the framework residue is a residue capable of affecting heavy chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the 3D6 immunoglobulin heavy chain variable region.

8. The light chain of claim 6, wherein the framework residue is selected from the group consisting of a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, a rare residue, and a glycoslyation site residue on the surface of the structural model.

9. The heavy chain of claim 7, wherein the framework residue is selected from the group consisting of a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, an unusual residue, and a glycoslyation site residue on the surface of the structural model.

10. The light chain of claim 6 or 8, wherein the framework residue is identified by modeling the 3D6 light chain based on the solved structure of 1CR9.

11. The light chain of claim 6 or 8, wherein the frame work residue is identified by modeling the 3D6 light chain based on the solved structure of 1NLD.

12. The heavy chain of claim 7 or 9, wherein the framework residue is identified by modeling the 3D6 heavy chain based on the solved structure of 1OPG.

13. A humanized immunoglobulin light chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin light chain, provided that at least one framework residue selected from the group consisting of L1, L2, L36 and L46 (Kabat numbering convention) is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light chain variable region sequence.

14. A humanized immunoglobulin heavy chain comprising (i) variable region complementarity determining regions from the 3D6 heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:4, and (ii) a variable framework regions from a human acceptor immunoglobulin heavy chain, provided that at least one framework residue selected from the group consisting of H49, H93 and H94 (Kabat numbering convention) is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 heavy chain variable region sequence.

15. The light chain of any one claims 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11 and 13, wherein the human acceptor light chain is of the subtype kappa II (Kabat convention).

16. The heavy chain of any one claims 2, 5, 7, 9, 12 and 14, wherein the human acceptor heavy chain is of the subtype III (Kabat convention).

17. The light chain of claim 15, wherein the human acceptor light chain is selected from the group consisting of Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 and Kabat ID U41645.

18. The light chain of claim 15, wherein the human acceptor light chain is Kabat ID 019230.

19. The heavy chain of claim 16, wherein the human acceptor heavy chain is selected from the group consisting of Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 and Kabat ID M23691.

20. The heavy chain of claim 16, wherein the human acceptor heavy chain is Kabat ID 045919.

21. The light chain of any one of claims 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 and 18, wherein at least one rare human framework residue is substituted with an amino acid residue which is common for human variable light chain sequences at that position.

22. The light chain of claim 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 and 18,, wherein at least one rare human framework residue is substituted with a corresponding amino acid residue from a germline variable light chain sequence.

23. The light chain of claim 22, wherein the germline variable light chain sequence is selected from the group consisting of A1, A17, A18, A2, and A19.

24. The heavy chain of any one of claims 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 and 20, wherein at least one rare human framework residue is substituted with an amino acid residue which is common for human variable heavy chain sequences at that position.

25. The heavy chain of any one of claims 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 and 20, wherein at least one rare human framework residue is substituted with a corresponding amino acid residue from a germline variable heavy chain sequence.

26. The heavy chain of claim 25, wherein the germline variable heavy chain sequence is selected from the group consisting of VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 and VH3-11.

27. The heavy chain of claim 25, wherein the germline variable heavy chain sequence is VH3-23.

28. The light chain of any one of claims 21-23, wherein the rare framework residue is selected based on occurrence at that position in less than 10% of human light chain variable region sequences in the light chain variable region subgroup, and the common residue is selected based on an occurrence at that position in greater than 50% of sequences in the light chain variable region subgroup.

29. The heavy chain of any one of claims 24-26, wherein the rare framework residue is selected based on occurrence at that position in less than 10% of human heavy chain variable region sequences in the heavy chain variable region subgroup, and the common residue is selected based on an occurrence at that position in greater than 50% of sequences in the heavy chain variable region subgroup.

30. A light chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) and variable region framework residues L1, L2, L36 and L46 (Kabat numbering convention) from the monoclonal antibody 3D6 light chain, wherein the remainder of the light chain is from a human immunoglobulin.

31. A heavy chain comprising the complementarity determining regions (CDRs) and variable framework residues H49, H93 and H94 (Kabat numbering convention) from the monoclonal antibody 3D6 heavy chain, wherein the remainder of the heavy chain is from a human immunoglobulin.

32. A humanized immunoglobulin comprising the light chain of any one of claims 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 and 18, and the heavy chain of any one of claims 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 and 20, or antigen binding fragment of said immunoglobulin.

33. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^7 M^{-1}.

34. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^8 M^{-1}.

35. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^9 M^{-1}.

36. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, wherein the heavy chain isotype is γ1.

37. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which binds to both soluble beta amyloid peptide (Aβ) and aggregated Aβ.

38. The immunoglobulin of claim 37, wherein the soluble beta amyloid peptide (Aβ) is disaggregated Aβ.

39. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which mediates phagocytosis of beta amyloid peptide (Aβ).

40. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which crosses the blood-brain barrier in a subject.

41. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 32, which reduces both beta amyloid peptide (Aβ) burden and neuritic dystrophy in a subject.

42. A humanized immunoglobulin comprising a humanized heavy chain and a humanized light chain, wherein

(a) the humanized light chain comprises three complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementarity determining regions of the mouse 3D6 immunoglobulin light chain variable domain designated SEQ ID NO:2, and a variable region framework from a human light chain variable region framework sequence provided that at least one position selected from a first group consisting of L1, L2, L36 and L46 (Kabat numbering convention) is occupied by the same amino acid residue present in the equivalent position of the mouse 3D6 immunoglobulin light chain variable region framework; and

(b) the humanized heavy chain comprises three complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementarity determining regions of the mouse 3D6 immunoglobulin heavy chain variable domain designated SEQ ID NO:4, and a variable region framework from a human heavy chain variable region framework sequence provided that at least one position selected from a second group consisting of H49, H93 and H94 (Kabat numbering convention) is occupied by the same amino acid residue present in the equivalent position of the mouse 3D6 immunoglobulin heavy chain variable region framework;

wherein the humanized immunoglobulin specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^7 M^{-1}, wherein the 3D6 immunoglobulin has the light chain with a variable domain designated SEQ ID NO:2 and the heavy chain with a variable domain designated SEQ ID NO: 4.

43. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein human light chain variable region framework is from a kappa light chain variable region.

44. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein human heavy chain variable region framework is from an IgG1 heavy chain variable region.

45. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein the humanized light chain variable region framework is from a light chain selected from the group consisting of Kabat ID 019230, Kabat ID 005131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID 005059, Kabat ID U21040 and Kabat ID U41645.

46. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein the humanized heavy chain variable region framework is from a heavy chain selected from the group consisting of Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 and Kabat ID M23691.

47. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein the humanized light chain variable region framework is identical to the Kabat ID 019230 light chain variable region framework sequence except for the positions from the first group, and the heavy chain variable region framework is identical to the Kabat ID 045919 heavy chain variable region framework sequence except for the positions from the second group.

48. The humanized immunoglobulin of claim 42, wherein the humanized light chain comprises complementarity determining regions that are identical to the corresponding complementarity determining regions of the mouse 3D6 heavy chain, and the humanized heavy chain comprises complementarity determining regions that are

identical to the corresponding complementarity determining regions of the mouse 3D6 heavy chain.

49. A humanized antibody comprising the complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) of the 3D6 variable light chain sequence set forth as SEQ ID NO:2.

50. A humanized antibody comprising the complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) of the 3D6 variable heavy chain sequence set forth as SEQ ID NO:4.

51. A humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ), comprising a variable region comprising complementarity determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from the mouse 3D6 antibody.

52. A humanized antibody which binds beta amyloid peptide (Aβ) with an affinity of at least 10^7 M^{-1} comprising:

(a) a light chain variable domain comprising murine 3D6 complementarity determining region (CDR) amino acid residues and human VL subgroup II variable domain framework region (FR) amino acid residues; and

(b) a heavy chain variable domain comprising murine 3D6 complementarity determining region (CDR) amino acid residues and human VH subgroup III variable domain framework region (FR) amino acid residues.

53. A chimeric immunoglobulin comprising variable region complementarity determining regions (CDRs) from the 3D6 immunoglobulin variable region sequences set forth as SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, and variable framework regions from a human acceptor immunoglobulin.

54. An immunoglobulin, or antigen-binding fragment thereof, comprising a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:8 and a variable light chain region as set forth in SEQ ID NO:5.

55. An immunoglobulin, or antigen-binding fragment thereof, comprising a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:12 and a light chain region as set forth in SEQ ID NO:11.

56. An immunoglobulin comprising a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:8, a variable light chain region as set forth in SEQ ID NO:5, and constant regions from IgG1.

57. An immunoglobulin comprising a variable heavy chain region as set forth in SEQ ID NO:12, a light chain region as set forth in SEQ ID NO:11, and constant regions from IgG1.

58. A method of preventing or treating an amyloidogenic disease in a patient, comprising administering to the patient an effective dosage of the humanized immunoglobulin of any one of claims 32-52.

59. A method of preventing or treating Alzheimer's disease in a patient, comprising administering to the patient an effective dosage of the humanized immunoglobulin of any one of claims 32-52.

60. The method of claim 59, wherein the effective dosage of humanized immunoglobulin is 1 mg/kg body weight.

61. The method of claim 59, wherein the effective dosage of humanized immunoglobulin is 10 mg/kg body weight.

62. A pharmaceutical composition comprising the immunoglobulin of any one of claims 32-52 and a pharmaceutical carrier.

63. An isolated polypeptide comprising a fragment of SEQ ID NO:2 selected from the group consisting of amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

64. An isolated polypeptide comprising amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

65. An isolated polypeptide comprising a fragment of SEQ ID NO:4 selected from the group consisting of amino acids 31-35 of SEQ ID NO:4, amino acids 50-66 of SEQ ID NO:4 and amino acids 99-107 of SEQ ID NO:4.

66. An isolated polypeptide comprising amino acids 31-35 of SEQ ID NO:4, amino acids 50-66 of SEQ ID NO:4 and amino acids 99-107 of SEQ ID NO:4.

67. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

68. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

69. A variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, said variant comprising at least one conservative amino acid substitution, wherein the variant retains the ability to direct specific binding to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^7 M^{-1}.

70. A variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4, said variant comprising at least one conservative amino acid substitution, wherein the variant retains the ability to specifically bind beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^7 M^{-1}.

71. An isolated polypeptide comprising residues 1-112 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or comprising residues 1-119 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

72. An isolated nucleic acid molecule encoding the light chain of any one of claims 1, 3, 4, 6, 8, 10, , 11, 13, 15, 17 and 18.

73. An isolated nucleic acid molecule encoding the heavy chain of any one of claims 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 and 20.

74. An isolated nucleic acid molecule encoding the polypeptide of any one of claims 64-71.

75. An isolated nucleic acid molecule encoding the immunoglobulin of any one of claims 32-57.

76. An isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 3.

77. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of claims 72-76.

78. A host cell comprising the nucleic acid molecule of any of claims 72-76.

79. A method of producing an antibody, or fragment thereof, comprising culturing the host cell of claim 45 under conditions such that the antibody or fragment is produced and isolating said antibody from the host cell or culture.

80. A method of producing an antibody or fragment thereof, said method comprising culturing a host cell that expresses a nucleic acid molecule encoding said antibody or fragment under conditions such that the antibody or fragment is produced, and isolating said antibody or fragment from the host cell or culture, wherein said

antibody or fragment comprises amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

81. A method of producing an antibody or fragment thereof, said method comprising culturing a host cell that expresses a nucleic acid molecule encoding said antibody or fragment, under conditions such that the antibody or fragment is produced, and isolating said antibody from the host cell or culture, wherein said antibody or fragment comprises amino acids 31-35 of SEQ ID NO:4, amino acids 50-66 of SEQ ID NO:4 and amino acids 99-112 of SEQ ID NO:4.

82. A method for identifying residues amenable to substitution in a humanized 3D6 immunoglobulin variable framework region, comprising modeling the three-dimensional structure of the 3D6 variable region based on a solved immunoglobulin structure and analyzing said model for residues capable of affecting 3D6 immunoglobulin variable region conformation or function, such that residues amenable to substitution are identified.

83. Use of the variable region sequence set forth as SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, or any portion thereof, in producing a three-dimensional image of a 3D6 immunoglobulin, 3D6 immunoglobulin chain, or domain thereof.

84. A humanized immunoglobulin light chain comprising (i) variable region complementary determining regions (CDRs) from the 10D5 immunoglobulin light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin light chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 light chain variable region sequence, wherein the framework residue is selected from the group consisting of:

(a) a residue that non-covalently binds antigen directly;

(b) a residue adjacent to a CDR;

(c) a CDR-interacting residue; and

(d) a residue participating in the VL-VH interface.

85. A humanized immunoglobulin heavy chain comprising (i) variable region complementary determining regions (CDRs) from the 10D5 immunoglobulin heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:16, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 heavy chain variable region sequence, wherein the framework residue is selected from the group consisting of:

(a) a residue that non-covalently binds antigen directly;

(b) a residue adjacent to a CDR;

(c) a CDR-interacting residue; and

(d) a residue participating in the VL-VH interface.

86. The light chain of claim 84, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 70% sequence identity with the 10D5 light chain.

87. The light chain of claim 84, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 80% sequence identity with the 10D5 light chain.

88. The light chain of claim 84, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 90% sequence identity with the 10D5 light chain.

89. The heavy chain of claim 85, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chan that shares at least 70% sequence identity with the 10D5 heavy chain.

90. The heavy chain of claim 85, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chan that shares at least 80% sequence identity with the 10D5 heavy chain.

91. The heavy chain of claim 85, wherein a CDR-interacting residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chan that shares at least 90% sequence identity with the 10D5 heavy chain.

92. A humanized immunoglobulin light chain comprising (i) variable region complementary determining regions (CDRs) from the 10D5 immunoglobulin light chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin light chain sequence, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 light chain variable region sequence, wherein the framework residue is a residue capable of affecting light chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the 10D5 immunoglobulin light chain variable region.

93. A humanized immunoglobulin heavy chain comprising (i) variable region complementary determining regions (CDRs) from the 10D5 immunoglobulin heavy chain variable region sequence set forth as SEQ ID NO:16, and (ii) a variable framework region from a human acceptor immunoglobulin heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 heavy chain variable region sequence, wherein the framework residue is a residue capable of affecting heavy chain variable region conformation or function as identified by analysis of a three-dimensional model of the 10D5 immunoglobulin heavy chain variable region.

94. The light chain of claim 92, wherein the framework residue is selected from the group consisting of a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, a rare residue, and a glycoslyation site residue on the surface of the structural model.

95. The heavy chain of claim 93, wherein the framework residue is selected from the group consisting of a residue capable of interacting with antigen, a residue proximal to the antigen binding site, a residue capable of interacting with a CDR, a residue adjacent to a CDR, a residue within 6 Å of a CDR residue, a canonical residue, a vernier zone residue, an interchain packing residue, an unusual residue, and a glycoslyation site residue on the surface of the structural model.

96. The light chain of claim 92 or 94, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 70% sequence identity with the 10D5 light chain.

97. The light chain of claim 92 or 94, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 80% sequence identity with the 10D5 light chain.

98. The light chain of claim 92 or 94, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 light chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin light chain that shares at least 90% sequence identity with the 10D5 light chain.

99. The heavy chain of claim 93 or 95, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chain that shares at least 70% sequence identity with the 10D5 heavy chain.

100. The heavy chain of claim 93 or 95, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chain that shares at least 80% sequence identity with the 10D5 heavy chain.

101. The heavy chain of claim 93 or 95, wherein the framework residue is identified by modeling the 10D5 heavy chain based on the solved structure of a murine immunoglobulin heavy chain that shares at least 90% sequence identity with the 10D5 heavy chain..

102. The light chain of any one of claims 84, 86-88, 92, 94 and 96-98, wherein at least one rare human framework residue is substituted with an amino acid residue which is common for human variable light chain sequences at that position.

103. The light chain of any one of claims 84, 86-88, 92, 94 and 96-98, wherein at least one rare human framework residue is substituted with a corresponding amino acid residue from a germline variable light chain sequence.

104. The light chain of claim 103, wherein the germline variable light chain sequence is that of an immunoglobulin sharing at least 70% identity with the variable light chain sequence of sequence identity.

105. The light chain of claim 103, wherein the germline variable light chain sequence is that of an immunoglobulin sharing at least 80% identity with the variable light chain sequence of sequence identity.

106. The light chain of claim 103, wherein the germline variable light chain sequence is that of an immunoglobulin sharing at least 90% identity with the variable light chain sequence of sequence identity.

107. The heavy chain of any one of claims 85, 89-91, 93 and 99-101, wherein at least one rare human framework residue is substituted with an amino acid residue which is common for human variable heavy chain sequences at that position.

108. The heavy chain of any one of claims 85, 89-91, 93 and 99-101, wherein at least one rare human framework residue is substituted with a corresponding amino acid residue from a germline variable heavy chain sequence.

109. The heavy chain of claim 108, wherein the germline variable heavy chain sequence is that of or is sharing of at least 70% identity with the variable heavy chain sequence of SEQ ID NO:16.

110. The heavy chain of claim 108, wherein the germline variable heavy chain sequence is that of or is sharing of at least 80% identity with the variable heavy chain sequence of sequence identity no. 16.

111. The heavy chain of claim 108, wherein the germline variable heavy chain sequence is that of or is sharing of at least 90% identity with the variable heavy chain sequence of sequence identity no. 16.

112. The light chain of any one of claims 102-106, wherein the rare framework residue is selected based on occurrence at that position in less than 10% of human light chain variable region sequences in the light chain variable region subgroup, and the common residue is selected based on an occurrence at that position in greater than 50% of sequences in the light chain variable region subgroup.

113. The heavy chain of any one of claims 107-111, wherein the rare framework residue is selected based on occurrence at that position in less than 10% of human heavy chain variable region sequences in the heavy chain variable region subgroup, and the common residue is selected based on an occurrence at that position in greater than 50% of sequences in the heavy chain variable region subgroup.

114. A humanized immunoglobulin comprising the light chain of any one of claims 84, 86-88, 92, 94 and 96-98, and the heavy chain of any one of claims 85, 89-91, and 93 and 99-101, or antigen-binding fragment of said immunoglobulin.

115. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^{-7} M.

116. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^{-8} M.

117. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^{-9} M.

118. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, wherein the heavy chain isotype is γ1.

119. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which binds to aggregated beta amyloid peptide (Aβ).

120. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which mediates phagocytosis of beta amyloid peptide (Aβ).

121. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which crosses the blood-brain barrier in a subject.

122. The immunoglobulin or antigen binding fragment of claim 114, which reduces beta amyloid peptide (Aβ) plaque burden in a subject.

123. A humanized immunoglobulin comprising a humanized heavy chain and a humanized light chain, wherein

(a) the humanized light chain comprises three complementary determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementarily determining regions of the mouse 10D5 immunoglobulin light chain variable domain designated SEQ ID NO:14, and a variable region framework from a human light chain variable region framework sequence provided that at least one framework residue selected from the group consisting of a canonical residue, a vernier residue, a packing residue and a rare residue, is occupied by the same amino acid residue present in the equivalent position of the mouse 10D5 immunoglobulin light chain variable region framework; and

(b) the humanized heavy chain comprises three complementary determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementary determining regions of the mouse 10D5 immunoglobulin heavy chain variable domain designated SEQ ID NO:16, and a variable region framework from a human heavy chain variable region framework sequence provided that at least one framework residue selected from a second group consisting of a canonical residue, a vernier residue, a packing residue and a rare residue, is occupied by the same amino acid residue present in the equivalent position of the mouse 10D5 immunoglobulin heavy chain variable region framework;

wherein the humanized immunoglobulin specifically binds to beta amyloid peptide ("Aβ") with a binding affinity of at least 10^{-7} M, wherein the 10D5 immunoglobulin has the light chain with a variable domain designated SEQ ID NO:14 and the heavy chain with a variable domain designated SEQ ID NO:16.

124. The humanized immunoglobulin of claim 123, wherein human light chain variable region framework is from a kappa light chain variable region.

125. The humanized immunoglobulin of claim 123, wherein human heavy chain variable region framework is from an IgG1 heavy chain variable region.

126. The humanized immunoglobulin of claim 123, wherein the light chain variable region framework is from a human immunoglobulin light chain having at least 70% sequence identity with light chain sequence of the 10D5 immunoglobulin.

127. The humanized immunoglobulin of claim 123, wherein the heavy chain variable region framework is from a human immunoglobulin heavy chain having at least 70% sequence identity with heavy chain sequence of the 10D5 immunoglobulin..

128. The humanized immunoglobulin of claim 123, wherein the humanized light chain comprises complementary determining regions that are identical to the corresponding complementary determining regions of the mouse 10D5 heavy chain, and the humanized heavy chain comprises complementary determining regions that are identical to the corresponding complementary determining regions of the mouse 10D5 heavy chain.

129. A humanized antibody comprising the complementary determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) of the 10D5 variable light chain sequence set forth as SEQ ID NO:14.

130. A humanized antibody comprising the complementary determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) of the 10D5 variable heavy chain sequence set forth as SEQ ID NO:16.

131. A humanized antibody, or antigen-binding fragment thereof, which specifically binds to beta amyloid peptide (Aβ), comprising a variable region comprising complementary determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from the mouse 10D5 antibody.

132. A chimeric immunoglobulin comprising variable region sequence substantially as set forth in SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16, and constant region sequences from a human immunoglobulin.

133. A method of preventing or treating an amyloidogenic disease in a patient, comprising administering to the patient an effective dosage of the humanized immunoglobulin of any one of claims 114-131.

134. A method of preventing or treating Alzheimer's disease in a patient, comprising administering to the patient an effective dosage of the humanized immunoglobulin of any one of claims 114-131.

135. The method of claim 134, wherein the effective dosage of humanized immunoglobulin is 1 mg/kg body weight.

136. The method of claim 134, wherein the effective dosage of humanized immunoglobulin is 10 mg/kg body weight.

137. A pharmaceutical composition comprising the immunoglobulin of any one of claims 114-131 and a pharmaceutical carrier.

138. An isolated polypeptide comprising a fragment of SEQ ID NO:2 selected from the group consisting of amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

139. An isolated polypeptide comprising amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

140. An isolated polypeptide comprising a fragment of SEQ ID NO:4 selected from the group consisting of amino acids 31-37 of SEQ ID NO:4, amino acids 52-67 of SEQ ID NO:4 and amino acids 100-112 of SEQ ID NO:4.

141. An isolated polypeptide comprising amino acids 31-37 of SEQ ID NO:4, amino acids 52-67 of SEQ ID NO:4 and amino acids 100-112 of SEQ ID NO:4.

142. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:14.

143. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

144. A variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:14, said variant comprising at least one conservative amino acid substitution, wherein the variant retains the ability to specifically bind beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^{-7} M.

145. A variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:16, said variant comprising at least one conservative amino acid substitution, wherein the variant retains the ability to direct specific binding to beta amyloid peptide (Aβ) with a binding affinity of at least 10^{-7} M.

146. An isolated polypeptide comprising residues 1-112 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:14 or comprising residues 1-123 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

147. An isolated nucleic acid molecule encoding the light chain of any one of claims 84, 86-88, 92, 94 and 96-98.

148. An isolated nucleic acid molecule encoding the heavy chain of any one of claims 85, 89-91, 93 and 99-101.

149. An isolated nucleic acid molecule encoding the polypeptide of any one of claims 139-146.

150. An isolated nucleic acid molecule encoding the immunoglobulin of any one of claims 114-132.

151. An isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:13 or 15.

152. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of claims 147-151.

153. A host cell comprising the nucleic acid molecule of any of claims 147-151.

154. A method of producing an antibody, or fragment thereof, comprising culturing the host cell of claim 153 under conditions such that the antibody or fragment is produced and isolating said antibody from the host cell or culture.

155. A method of producing an antibody, or fragment thereof, said method comprising culturing a host cell that expresses a nucleic acid molecule encoding said antibody or fragment under conditions such that the antibody or fragment is produced, and isolating said antibody from the host cell or culture, wherein said antibody or fragment comprises amino acids 24-39 of SEQ ID NO:2, amino acids 55-61 of SEQ ID NO:2 and amino acids 94-102 of SEQ ID NO:2.

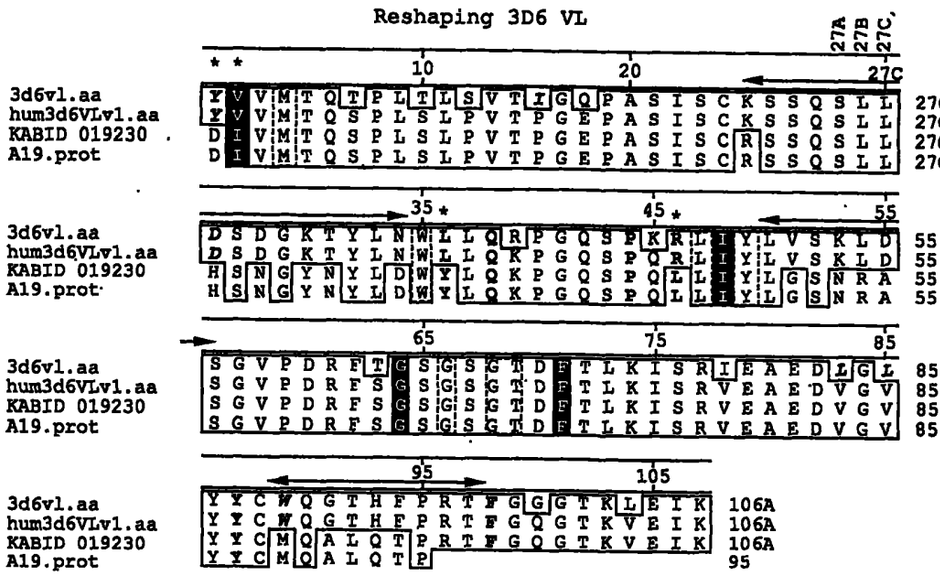
156. A method of producing an antibody, or fragment thereof, said method comprising culturing a host cell that expresses a nucleic acid molecule encoding said antibody or fragment under conditions such that the antibody or fragment is produced, and isolating said antibody from the host cell or culture, wherein said antibody or

fragment comprises amino acids 31-37 of SEQ ID NO:4, amino acids 52-67 of SEQ ID NO:4 and amino acids 100-112 of SEQ ID NO:4.

157. A method for identifying residues amenable to substitution in a humanized 10D5 immunoglobulin variable framework region, comprising modeling the three-dimensional structure of the 10D5 variable region based on a solved immunoglobulin structure and analyzing said model for residues capable of affecting 10D5 immunoglobulin variable region conformation or function, such that residues amenable to substitution are identified.

158. Use of the variable region sequence set forth as SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16, or any portion thereof, in producing a three-dimensional image of a 10D5 immunoglobulin, 10D5 immunoglobulin chain, or domain thereof.

FIG. 1



'Decoration #1': Box residues that match hum3D6VLv1.aa exactly. Residue numbering cf Kabat

3d6v1.aa - Donor murine sequence

hum3d6VLv1.aa - humanized 3d6

KABID 019230 - human acceptor framework

A19.prot - human germline VH

FIG. 2

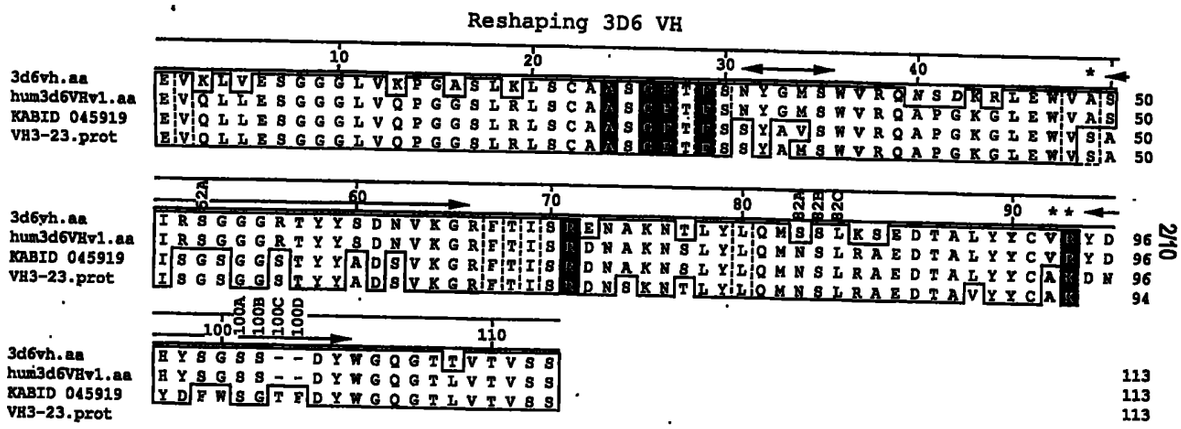

Reshaping 3D6 VH
3d6vh.aa
hum3d6VHv1.aa
KABID 045919
VH3-23.prot
'Decoration #1': Box residues that match hum3d6VHv1.aa exactly. Residue Numbering of Kabat
3d6vh.aa - Donor murine sequence
hum3d6VHv1.aa - humanized 3d6 VH
KABID 045919 - human acceptor framework
VH3-23.prot - human germline VH

FIG. 3A

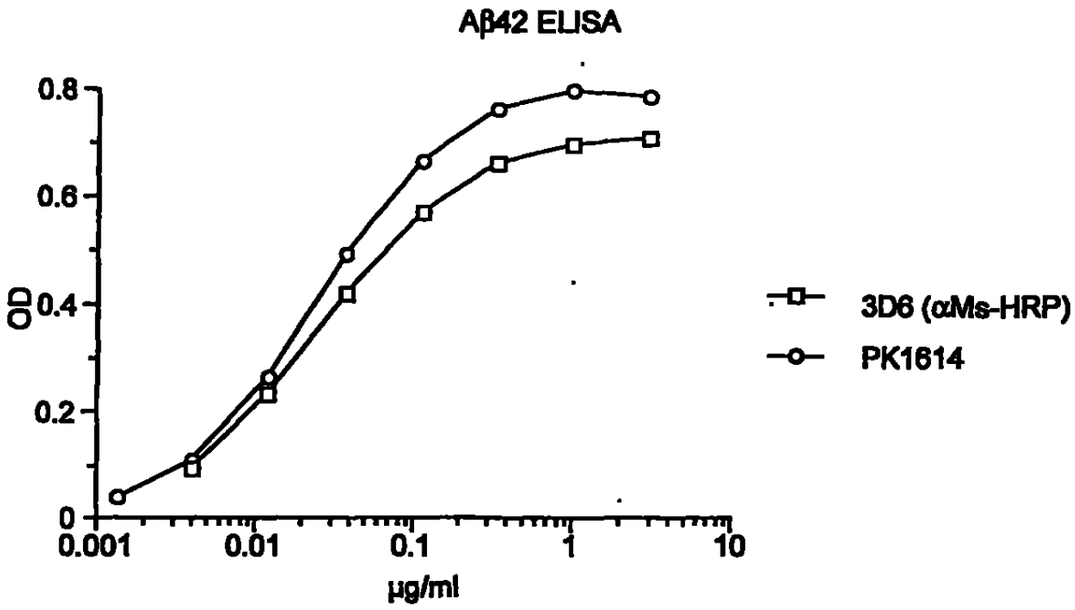

Aβ42 ELISA
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD
0.001
0.01
0.1
1
10
µg/ml
3D6 (αMs-HRP)
PK1614

FIG. 3B

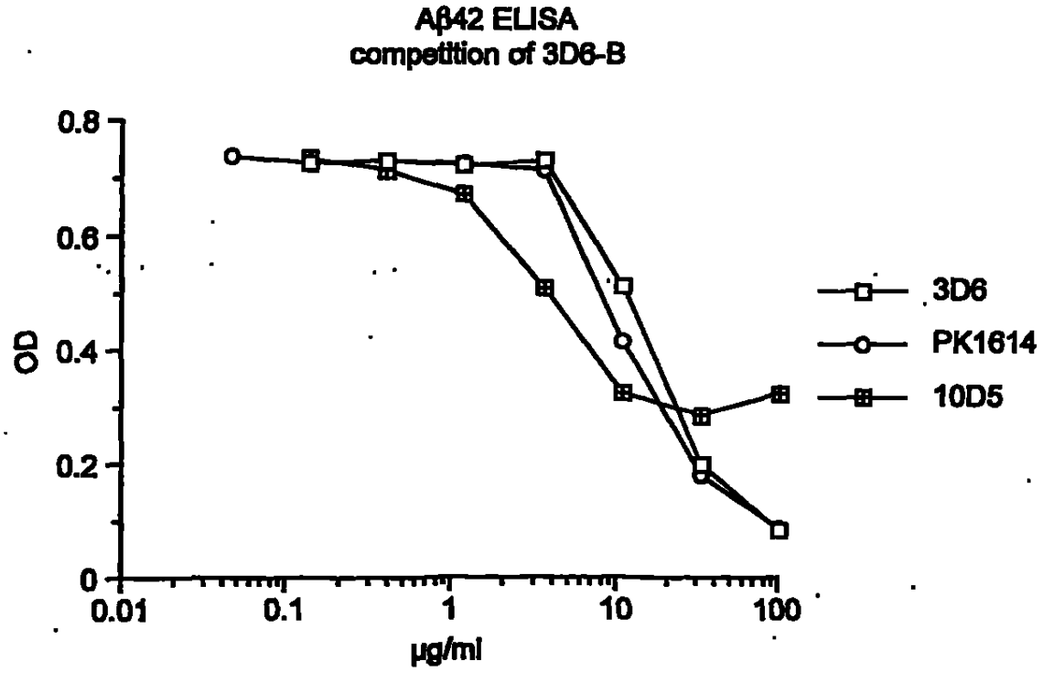

Aβ42 ELISA
competition of 3D6-B
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD
0.01
0.1
1
10
100
µg/ml
3D6
PK1614
10D5

FIG. 4

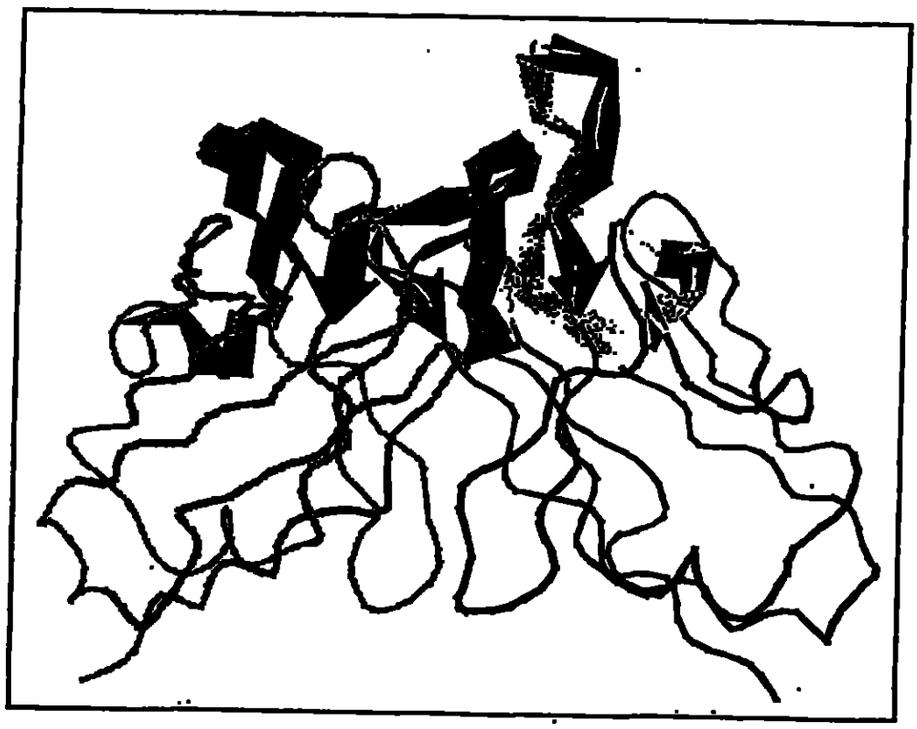


FIG. 5A

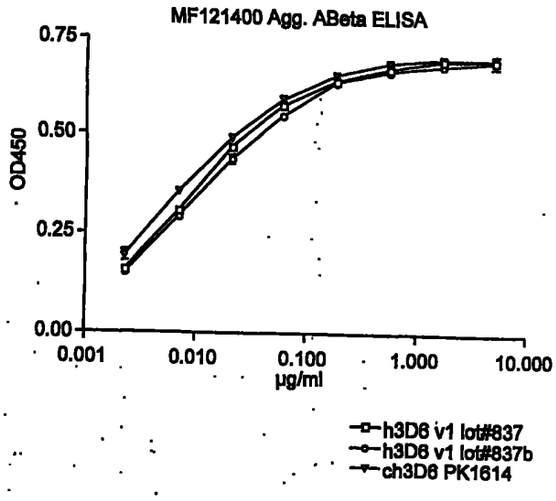

MF121400 Agg. ABeta ELISA
OD450
0.75
0.50
0.25
0.00
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
µg/ml
h3D6 v1 lot#837
h3D6 v1 lot#837b
ch3D6 PK1614

FIG. 5B

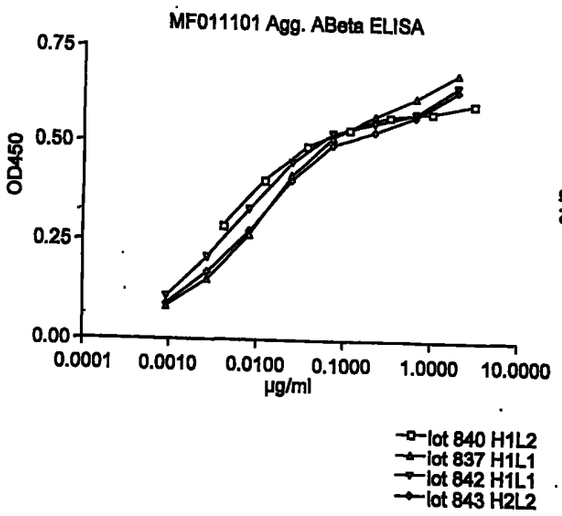

MF011101 Agg. ABeta ELISA
OD450
0.75
0.50
0.25
0.00
0.0001
0.0010
0.0100
0.1000
1.0000
10.0000
µg/ml
lot 840 H1L2
lot 837 H1L1
lot 842 H1L1
lot 843 H2L2

FIG. 6

Staining of PDAPP brain sections with humanized 3D6

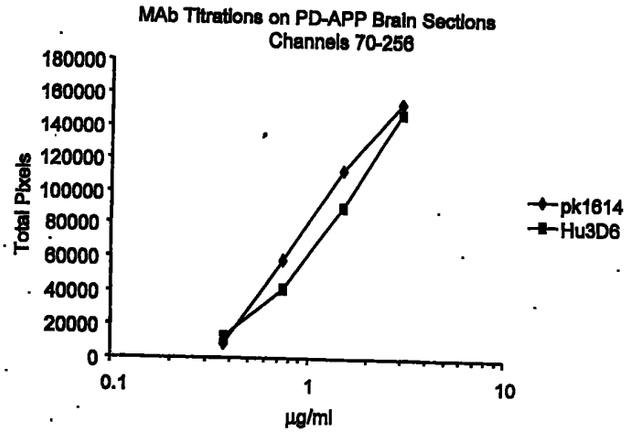


FIG. 7

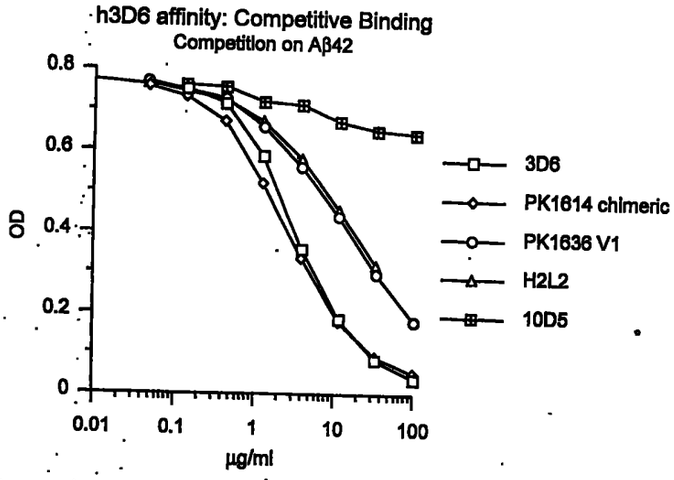

h3D6 affinity: Competitive Binding
Competition on Aβ42
OD
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.01
0.1
1
10
100
µg/ml
3D6
PK1614 chimeric
PK1636 V1
H2L2
10D5

FIG. 8

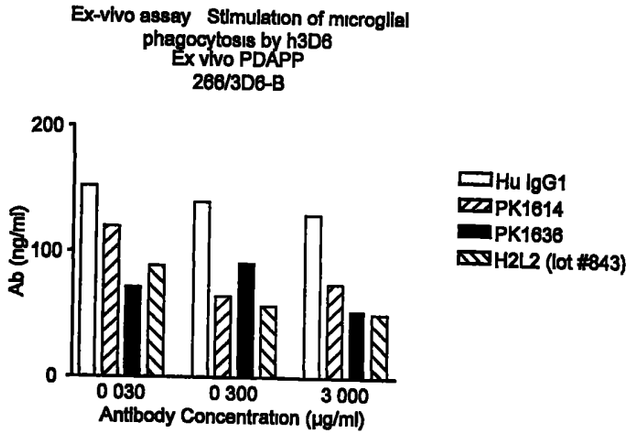

Ex-vivo assay Stimulation of microglial phagocytosis by h3D6
Ex vivo PDAPP
266/3D6-B
200
100
0
Ab (ng/ml)
0 030
0 300
3 000
Antibody Concentration (µg/ml)
Hu IgG1
PK1614
PK1636
H2L2 (lot #843)

FIG. 9

```
                          10                  20
                          |                   |
10D5v1 pro  M K L P V R L L - V L M F W I P A S S S D V L M T Q T P L S   29
3D6v1 pro   M M S P A Q F L F L L V L W I R E T N G Y V V M T Q T P L T   30

           30                  40                  50
            |                   |                   |
10D5v1 pro  L P V S L G D Q A S I S C R S S Q N I I H S N G N T Y L E W   59
3D6v1 pro   L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W   60

           60                  70                  80
            |                   |                   |
10D5v1 pro  Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S   89
3D6v1 pro   L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F T G S   90

           90                  100                 110
            |                   |                   |
10D5v1 pro  G S G T D F T L K I K K V E A E D L G I Y Y C F Q G S H V P   119
3D6v1 pro   G S G T D F T L K I S R I E A E D L G L Y Y C W Q G T H F P   120

          120                 130
            |                   |
10D5v1 pro  L T F G A G T K L E L E                                       131
3D6v1 pro   R T F G G G T K L E I K                                       132
```

FIG. 10

```
                                10                  20                  30
10D5vh pro  M D - R L T S S F L L L I V P A Y V L S Q A T L K E S G P G
3D6vh PRO   M N F G L S L I F L V L V L K G - V Q C E V K L V E S G G G   29

                                40                  50                  60
10D5vh pro  I L Q S S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V S W I R
3D6vh PRO   L V K P G A S L K L S C A A S G F T F S N Y G M - - S W V R   57

                                70                  80                  90
10D5vh pro  Q P S G K G L E W L A H I Y W D D D K R Y - N P S L K S R L
3D6vh PRO   Q N S D K R L E W V A S I R S G G G R T Y Y S D N V K G R F   87

                               100                 110                 120
10D5vh pro  T I S K D T S R K Q V F L K I T S V D P A D T A T Y Y C V R
3D6vh PRO   T I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L Y Y C V R   117

                               130                 140
10D5vh pro  R P I T P V L V D A M D Y W G Q G T S V T V S S
3D6vh PRO   - - - Y D H Y S G S S D Y W G Q G T T V T V S S
```

142
138

153
154

SEQUENCE LISTING

<110> Neuralab Limited

<120> Humanized Antibodies that Recognize
Beta-Amyloid Peptide

<130> ELN-002PC

<150> 60/251,892
<151> 2000-12-06

<160> 63

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 396
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(396)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(60)

<400> 1

```
atg atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg   48
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20                 -15                 -10                 -5

gaa acc aac ggt tat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg   96
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
                1               5                  10

gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc   144
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        15                  20                  25

ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg   192
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
    30                  35                  40

cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac   240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45                  50                  55                  60

tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt   288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat   336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
            80                  85                  90
```

```
tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag   384
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
          95                  100                 105

ctg gaa atc aaa                                                  396
Leu Glu Ile Lys
    110
```

<210> 2
<211> 132
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(20)

<400> 2

```
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20                 -15                 -10                 -5
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
                 1               5                  10
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        15                  20                  25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
    30                  35                  40
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45                  50                  55                  60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
            80                  85                  90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        95                  100                 105
Leu Glu Ile Lys
    110
```

<210> 3
<211> 414
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(414)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 3

```
atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt   48
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
               -15                 -10                  -5

gtc cag tgt gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag   96
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
            1               5                  10
```

```
cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc   144
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
     15                  20                  25

agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg   192
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
 30                  35                  40                  45

gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca   240
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                 50                  55                  60

gac aat gta aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gag aat gcc aag aac   288
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
             65                  70                  75

acc ctg tac ctg caa atg agt agt ctg aag tct gag gac acg gcc ttg   336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
         80                  85                  90

tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg   384
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
     95                  100                 105

ggc cag ggc acc act gtc aca gtc tcc tca                           414
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110                 115
```

<210> 4
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 4

```
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
                -15                 -10                 -5
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
                 1                   5                  10
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
    15                  20                  25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
30                  35                  40                  45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                50                  55                  60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
            65                  70                  75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
        80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
    95                  100                 105
Gly Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
110                 115
```

<210> 5
<211> 132
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(20)

<223> humanized 3D6 light chain variable region

<400> 5
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
1 5 10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
30 35 40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
80 85 90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
95 100 105
Val Glu Ile Lys
110

<210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 6
Met Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val
-15 -10 -5
Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
1 5 10
Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr
15 20 25
Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
30 35 40 45
Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
65 70 75
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr
80 85 90
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
95 100 105

<210> 7
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
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> 8
<211> 138
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized 3D6 heavy chain variable region

<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 8
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
-15 -10 -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
15 20 25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30 35 40 45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
50 55 60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
80 85 90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys

<210> 11
<211> 132
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(20)

<223> humanized 3D6 light chain variable region

<400> 11
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5
Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
1 5 10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
30 35 40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
80 85 90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
95 100 105
Val Glu Ile Lys
110

<210> 12
<211> 138
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized 3D6 light chain variable region

<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 12
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
-15 -10 -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
15 20 25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30 35 40 45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
50 55 60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
65 70 75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 13
<211> 393
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(393)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 13
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
15 20 25

ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90

ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105

gag ctg gaa 393
Glu Leu Glu
110

<210> 14
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 14
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
15 20 25
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105
Glu Leu Glu
110

<210> 15
<211> 426
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(426)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 15
atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat 48
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
-15 -10 -5

gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag 96
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
1 5 10

tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg 144
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
15 20 25

agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag 192
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
30 35 40 45

ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat 240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
50 55 60

aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga 288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
65 70 75

aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc 336
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
80 85 90

```
aca tac tac tgt gtt cga agg ccc att act ccg gta cta gtc gat gct   384
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
     95                  100                 105

atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca           426
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110                 115                 120
```

<210> 16
<211> 142
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)...(19)

<400> 16

```
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
                -15                 -10                 -5
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
             1                   5                  10
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    15                  20                  25
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
30                  35                  40                  45
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                50                  55                  60
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
            65                  70                  75
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
        80                  85                  90
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
    95                  100                 105
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110                 115                 120
```

<210> 17
<211> 136
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17

```
tccgcaagct tgccgccacc atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga 60
tgctgtgggt gtccggctcc tccggctacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc 120
ccgtgacccc cggcga                                                 136
```

<210> 18
<211> 131
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
ctggggggac tggccgggct tctgcagcag ccagttcagg taggtcttgc cgtcggagtc 60
cagcagggac tgggaggact tgcaggagat ggaggcgggc tcgccggggg tcacgggcag 120
ggacaggggg g 131

<210> 19
<211> 146
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 19
acctgaactg gctgctgcag aagcccggcc agtcccccca gcgcctgatc tacctggtgt 60
ccaagctgga ctccggcgtg cccgaccgct tctccggctc cggctccggc accgacttca 120
ccctgaagat ctcccgcgtg gaggcc 146

<210> 20
<211> 142
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 20
aattctagga tccactcacg cttgatctcc accttggtgc cctggccgaa ggtgcggggg 60
aagtgggtgc cctgccagca gtagtacacg cccacgtcct cggcctccac gcgggagatc 120
ttcagggtga agtcggtgcc gg 142

<210> 21
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 21
ctggggggac tggccg 16

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 22
acctgaactg gctgctgcag aa 22

<210> 23
<211> 138
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 23
acagaaagct tgccgccacc atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt 60
taaaaggtgt ccagtgtgag gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg 120
gcggctccct gcgcctgt 138

<210> 24
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 24
gccgccggag cggatggagg ccacccactc caggcccttg ccgggggcct ggcgcaccca 60
ggacatgccg tagttggaga aggtgaagcc ggaggcggcg caggacaggc gcagggagcc 120
gccgggctgc accag 135

<210> 25
<211> 142
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 25
ctggagtggg tggcctccat ccgctccggc ggcggccgca cctactactc cgacaacgtg 60
aagggccgct tcaccatctc ccgcgacaac gccaagaact ccctgtacct gcagatgaac 120
tccctgcgcg ccgaggacac cg 142

<210> 26
<211> 144
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 26
ctgcaaggat ccactcaccg gaggacacgg tcaccagggt gccctggccc cagtagtcgg 60
aggagccgga gtagtggtcg tagcgcacgc agtagtacag ggcggtgtcc tcggcgcgca 120
gggagttcat ctgcaggtac aggg 144

<210> 27
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 27
gccgccggag cggatg 16

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 28
ctggagtggg tggcctccat 20

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 29
tccgcaagct tgccgccac 19

<210> 30
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
aattctagga tccactcacg cttgatctc 29

<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 31
acagaaagct tgccgccacc atg 23

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 32
ctgcaaggat ccactcaccg ga 22

<210> 33
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> internal peptide

<400> 33
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 402
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> h3D6 version 1 VL

<400> 34
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggctacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtcc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccgggt ccggcaccga cttcaccctg 300
aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
ttcccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 35
<211> 402
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> h3D6 version 2 VL

<400> 35
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggcgacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtcc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300
aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
ttcccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 36
<211> 414
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> h3D6 version 1 VH

<400> 36
atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgcgccgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360

tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 414

<210> 37
<211> 414
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> h3D6 version 2 VH

<400> 37
atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgcgccgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaact ccaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccgtgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc

<210> 38
<211> 770
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 38

Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg
1				5				10					15		
Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro
			20					25					30		
Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln
		35					40					45			
Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Thr	Cys	Ile	Asp
	50					55					60				
Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu
65					70					75					80
Gln	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Glu	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Asn
				85					90					95	
Trp	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Thr	His	Pro	His	Phe	Val
			100					105					110		
Ile	Pro	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Leu
		115					120					125			
Val	Pro	Asp	Lys	Cys	Lys	Phe	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Cys
	130					135					140				
Glu	Thr	His	Leu	His	Trp	His	Thr	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu
145					150					155					160
Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	Pro	Cys	Gly	Ile
				165					170					175	
Asp	Lys	Phe	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Cys	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu
			180					185					190		
Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Val
		195					200					205			
Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys
	210					215					220				
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu
225					230					235					240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu
				245					250					255	
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile
			260					265					270		

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
275 280 285
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
290 295 300
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
305 310 315 320
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
325 330 335
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
340 345 350
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
355 360 365
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
370 375 380
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
385 390 395 400
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
405 410 415
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
420 425 430
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
435 440 445
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
450 455 460
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
465 470 475 480
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
485 490 495
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
500 505 510
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
515 520 525
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
530 535 540
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545 550 555 560
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
565 570 575
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
580 585 590
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
595 600 605
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610 615 620
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625 630 635 640
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
645 650 655
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660 665 670
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675 680 685
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690 695 700
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750
Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765
Gln Asn
770

<210> 39
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 39
acttatatct gtttt 15

<210> 40
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 40
acttatacac tttgt 15

<210> 41
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 41
acttatgttc attat 15

<210> 42
<211> 16
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 42
acttatgccc attgtt 16

<210> 43
<211> 15
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 43
acttatatat attgt 15

<210> 44
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 44
acttatgkyy attg 14

<210> 45
<211> 15
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 45
acttatgtat acayw 15

<210> 46
<211> 15
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 46
acttatggct ymtct 15

<210> 47
<211> 13
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 47
acttattccc att 13

<210> 48
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 48
acttatatgt tctc 14

<210> 49
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 49
acttataccc attt 14

<210> 50
<211> 11
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 50
ggacggttgg g 11

<210> 51
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 51
acttataggg tttt 14

<210> 52
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 52
acttatgggr tttt 14

<210> 53
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 53
acttatatgt agtt 14

<210> 54
<211> 13
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 54
acttatatgt gtt 13

<210> 55
<211> 15
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 55
acttatacgt atttt 15

<210> 56
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 56
acttatctts tttg 14

<210> 57
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 57
acttatrggg tttt 14

<210> 58
<211> 13
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 58
acttatgttt ttg 13

<210> 59
<211> 15
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 59
acttatmgtg mtttt 15

<210> 60
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 60
acttatggtc tctt 14

<210> 61
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 61
acttatatgt tttt 14

<210> 62
<211> 14
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 62
acttattttg ttat 14

<210> 63
<211> 11
<212> DNA
<213> <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primers

<400> 63
ggacgggaca g

12134
06654
175

543340-21

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United Kingdom in respect of Bermuda

   This Public Document

2. Has been signed by: DAVID DOYLE

3. Acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. Bears the seal/stamp DAVID DOYLE.
   NOTARY PUBLIC, BERMUDA

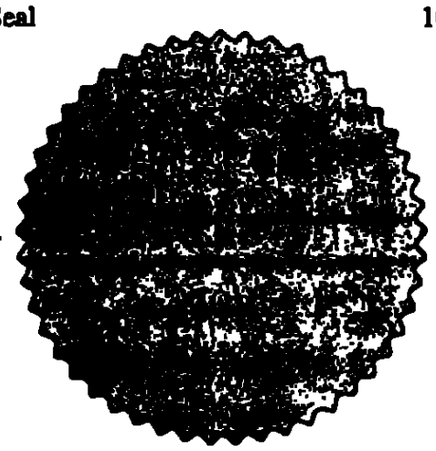
   Certified

5. At Bermuda 6. On 16th May, 2000

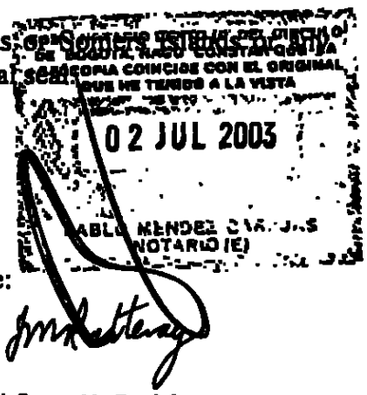
7. By the Governor and Commander-in-Chief of the Bermudas, or Somers Isles or any member of his staff, signing on his behalf and using his official seal.

8. Number: 2015

9. Seal



10. Signature:



Jennifer M Ratteray

For Governor and
Commander-in-Chief

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

No. **D619642**

Date **5 June, 2000**

This document bears
the signature / seal of **J M Ratteray**

Acting in the capacity of **Member Of The Staff Of The Governor And**
Commander-in-Chief, BERMUDA

Signed by: J. Garbrah





For Her Majesty's Principal Secretary of State
For Foreign and Commonwealth Affairs

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
3RD FLOOR, 15-19 GREAT TITCHFIELD STREET, LONDON W1P 7FB
TELEPHONE 020-7637 9893 • TELEFAX 020-7637 5604
E-MAIL consulco@consulco.demon.co.uk

175
176

El suscrito Cónsul General de Colombia en Londres, vistos los documentos presentados ante este Despacho,

CERTIFICA

Que, **DAVID DOYLE**, Notario Público de la Isla de Bermuda, autenticó la firma del documento precedente y su firma se encuentra certificada por **JENIFER M RATTERAY**, Oficial de la Gobernación de la Isla de Bermuda, firma que se encuentra legalizada por **J. GARBRAH**, Oficial del Ministerio de Relaciones Exteriores Británico, firma que a su vez se encuentra registrada en este Consulado General.

Que, **NEURALAB LIMITED** es una Sociedad constituída, organizada y existente en la Isla de Bermuda y que cumple con su objeto social de acuerdo a las leyes de esas Islas.

Que, **KEVIN INSLEY**, en su calidad de Representante Legal de la mencionada Sociedad, debidamente autorizado, otorga el Documento precedente y su firma se encuentra autenticada por **DAVID DOYLE**, Notario Público de la Isla de Bermuda.

El Cónsul General no asume responsabilidad por el contenido del mencionado documento.

Dado en Londres, Inglaterra, Gran Bretaña, a los siete (07) dias del mes de Junio de dos mil (2000).

Certificación No.06 /0807
Derechos: U$ 106,00 CANCELADOS

JAIME LOZADA PERDOMO
Cónsul General

IH

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
LONDRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

2841 51

JAIME LOZADA

COMPARECIÓ ANTE MI Y FIRMÓ EN MI PRESENCIA EL PRESENTE DOCUMENTO

2000 JUN 20 P 12:07

ITD SE ASUME RES. RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

LEGALIZACIONES

CONSULADO DE COLOMBIA EN BOGOTA D.C.

COMPARECIÓ ANTE EL DIL CIRCULO DE BOGOTA, PARA CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

12 JUL 2003

PABLO E... NOT

15210-004750 CO

176

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans, licenses.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales marcas de fábrica, nombres comerciales, enseña: lemas comerciales, licencias.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)

NEURALAB LIMITED

o/domiciliado (s) en 102 St. James Court

Flatts, Smiths, FL04 BERMUDA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas; variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con esos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 16 MAY

By: [signature]

Name: KEVIN INSLEY

Title: VICE PRESIDENT

NOTARIO SEXTO (6º) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

02 JUL 2003

© CAVELIER ABOGADOS

NM88122

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los ___ días del mes de _____ de 200___

ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

_____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es (son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____ 200___

before me, a Notary Public of _____

personally appeared _____

_____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has (have) legal capacity to execute it.

_____ Notario Público — Notary Public _____

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 16 de Mayo de 2000

compareció(eron) ante mí Kevin Inslem

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía

denominada NEURALAB LIMITED

_____

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

Memorandum de Asociacion y Articulos de Constitucion fechados 01/09/97 y 22/10/97, respectivamente.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que NEURALAB LIMITED

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bermuda

_____

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

Bermuda

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) Kevin Inslem

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Hamilton

Estado Bermuda

Hoy 16 de Mayo 2000

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16 day of May 2000

appeared before me Kevin Insley

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company

named NEURALAB LIMITED

_____

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

Memorandum of Association and Certificate of Incorporation dated 01/09/97 and 22/10/97, Respectively

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That NEURALAB LIMITED

is a Corporation / Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of BERMUDA.

_____

2.2. That the domicile of said Corporation /Company is

BERMUDA

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation /Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) _____

COBO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., CONSTITUYASE LA [illegible] QUE HE TENIDO A LA VISTA

_____

is (are) authorized to grant the present Power of Attorney

City HAMILTON

State BERMUDA

This 16 day of May 2000

_____ Notario Público — Notary Public _____

1.- Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

Documents must be

David J. Doyle
Notary Public
Commissioner for Oaths

REVENUE BERMUDA 85 REVENUE BERMUDA

178
179

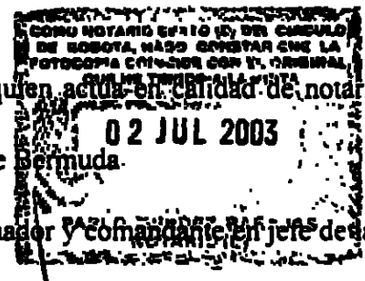
TRADUCCIÓN OFICIAL 077/2000 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA. TRADUCTOR OFICIAL, AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE FECHA 27 DE FEBRERO DE 1976 Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL MEDIANTE EL CUAL NEURALAB LIMITED, EMPRESA DOMICILIADA EN 102 ST. JAMES COURT, FLATTS, SMITHS. FLO4, BERMUDA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. OTORGADO Y FIRMADO HOY 16 DE MAYO DEL 2000 POR KEVIN INSLEY, VICE-PRESIDENTE.

CERTIFICADO NOTARIAL DE FECHA 16 DE MAYO DEL 2000 PARA CERTIFICAR LA COMPARECENCIA DE KEVIN INSLEM PARA OTORGAR ESTE PODER, SU CAPACIDAD PARA COMPROMETER LA EMPRESA NEURALAB LIMITED, LA EXISTENCIA LEGAL DE DICHA EMPRESA Y SU DOMICILIO. EXPEDIDO EN HAMILTON, BERMUDA, HOY 16 DE MAYO DEL 2000. FIRMADO DAVID J DOYLE, NOTARIO PÚBLICO, COMISIONADO DE JURAMENTOS. DOS ESTAMPILLAS CANCELADAS DE BERMUDA

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

1. País: El Reino Unido, con respecto a Bermuda



Este documento público ha sido firmado por David Doyle, quien actúa en calidad de notario público, lleva el sello/firma de David Doyle, notario público de Bermuda.

Certificado en Bermuda el 16 de mayo del 2000, por el gobernador y comandante en jefe de las Islas Bermudas o Somers o por cualquier miembro de su personal, que firma a su nombre y empleando su sello oficial. Número 2015. Sello realzado colocado sobre estrella plástica de color rojo. Firma: Jennifer M Ratteray, a nombre del gobernador y comandante en jefe.

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

NÚMERO D 619642. Fecha 5 de junio del 2000. Este documento lleva la firma/el sello de J M Ratteray, quien actua en calidad de miembro del personal asesor del Gobernador y comandante en jefe de Bermuda. Firmado por J Garbrah.

Sello: Oficina Extranjera y de la Comunidad, Londres

A nombre del secretario de estado principal de su majestad para asuntos extranjeros y de la comunidad.

La firma y cargo de David Doyle, la existencia de la empresa Neuralab Limited y la calidad de Kevin Insley, representante legal de dicha firma se encuentran autenticados mediante diligencia del 7 de junio del 2000 por el Consulado General de Colombia, mediante certificación #06/0807. Firmado: Jaime Lozada Perdomo, cónsul general. Sello: Consulado General de Colombia, Londres. La firma y funciones de Jaime Lozada se encuentran autenticados mediante diligencia # 284151 del 20 de junio del 2000 por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia. Firmado: Jefe de legalizaciones, Santafé de Bogotá, D.C.

Colo: 12184-801-001-7. ID 1398

Bogotá, 29 de junio del 2000.

Eduardo Calado N.

Eduardo [illegible]
TRADUCTOR PÚBLICO
INGLÉS - ESPAÑOL
Res. 54[illegible] de 1[illegible]

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

02 JUL 2003

PAUL[illegible]

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

OFICINA PRINCIPAL DE EL [illegible]

LEGALIZACIONES

LUNES JUN 29 P 12:54

DE LEGALIZACIONES

SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA. 29 JUN. 2000

NOTARIA SEXTA
PABLO [illegible]
BARAJAS

COPIA NOTARIAL
EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HACE CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL DOCUMENTO
QUE SE TUVO A LA VISTA
02 JUL 2003

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MANDRAGOURAS, Amy, E.
Lahive & Cockfield, LLP
28 State Street
Boston, MA 02109
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)	
29 May 2002 (29.05.02)	
Applicant's or agent's file reference	**IMPORTANT NOTIFICATION**
ELN-002PC	
International application No.	**International filing date (day/month/year)**
PCT/US01/46587	06 December 2001 (06.12.01)

1. The following indications appeared on record concerning:

[X] the applicant [ ] the inventor [ ] the agent [ ] the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

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

[X] the person [ ] the name [ ] the address [ ] the nationality [ ] the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
WYETH Five Giralda Farms Madison, NJ 07940 United States of America	US	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The applicant identified in Box 2 has been added to the records as an applicant for all designaged States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

[X] the receiving Office
[X] the International Searching Authority
[ ] 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
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

ENTERED
RECEIVED
LAHIVE & COCKFIELD
DOCKET DEPT.
JUN 10 2002
Y. KUWAHARA
6/14/02
RETRIEVED: 6/13 00487782
FORWARDED: 6/14/02

Form PCT/IB/308 (March 1994)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
LAHIVE & COCKFIELD, LLP
Attn. Mandragoutas, Amy E
28 State Street
Boston, Massachusetts 02109
UNITED STATES OF AMERICA

DOCKETED
Annual Letter Search – June 17, 2003

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference ELN-002PC	Date of mailing (day/month/year) 17/04/2003 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 01/46587	International filing date (day/month/year) 06/12/2001
Applicant NEURALAB LIMITED	

1. [X] The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is 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 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO
   34, chemin des Colombettes
   1211 Geneva 20, Switzerland
   Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] 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 is transmitted herewith.

3. [ ] 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.

4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:

   Shortly after 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 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

   Within 19 months from the priority date, 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).

   Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

RECEIVED
LAHIVE & COCKFIELD
DOCKET DEPT.
APR 24 2003
RETRIEVED: 5/1
FORWARDED: 5/1/03

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 Ms G. [illegible]

Form PCT/ISA/220 (July 1998)

COPY

4/30/03

183

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, 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.

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 (Administrative Instructions, 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).

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 Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
ELN-002PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US 01/46587	06/12/2001	06/12/2000
Applicant		
NEURALAB 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 9 sheets.

[X] 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, unless otherwise indicated under this item.

   [ ] the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

   b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

   [X] contained in the international application in written form.

   [X] filed together with the international application in computer readable form.

   [ ] furnished subsequently to this Authority in written form.

   [ ] furnished subsequently to this Authority in computer readble form.

   [ ] the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

   [ ] the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. [X] Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

   [X] 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,

   [X] 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 III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

   [ ] as suggested by the applicant.

   [ ] because the applicant failed to suggest a figure.

   [ ] because this figure better characterizes the invention.

   [X] None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/46587

185
186

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 58-61,133-136 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 69,70,144,145
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-83,138-141,155,156 (complete) 149 (partially)

Humanized immunoglobulin (Ig) light chain and heavy chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from 3D6 Ig light and heavy chain variable regions sequence set forth as seq ID. 2 and 4 respectively, and (ii) variable framework region from a human acceptor Ig light and heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 3D6 light and heavy chain variable region sequence. Furthermore, the subject matter comprises the related products and methods: chimeric Ig comprising CDRs from 3D6 Ig or antigen binding fragment thereof, comprising a variable heavy and light chain (set forth as seq. ID 8, 12 and seq. ID 5,11 respectively), humanized antibody, method of preventing or treating an amyloidogenic disease and Alzheimer in patients, pharmaceutical compositions comprising said Ig, isolated polypeptide or fragments (as referred to in claims 63-66), a variant of said polypeptide, nucleic acid, vectors and host cells to encode and produce said Ig, method to produce said Ig. Method for identifying residues amenable to substitution in a humanized 3D6 variable framework region and use of the variable sequence to produce a three dimensional image of 3D6 Ig.

2. Claims: 84-137,142-148,150-154,157, 158 (complete) 149 (partially)

Humanized immunoglobulin (Ig) light chain and heavy chain comprising (i) variable region complementarity determining regions (CDRs) from 10D5 Ig light and heavy chain variable regions sequence set forth as seq ID. 14 and 16 respectively, and (ii) variable framework region from a human acceptor Ig light and heavy chain, provided that at least one framework residue is substituted with the corresponding amino acid residue from the mouse 10D5 light and heavy chain variable region sequence. Furthermore, the subject matter comprises the related products and methods: chimeric Ig, humanized antibody, method of preventing or treating an amyloidogenic disease and Alzheimer in patients, pharmaceutical compositions comprising said Ig, isolated polypeptide, a variant of said polypeptide, nucleic acid, vectors and host cells to encode and produce said Ig, method to produce said Ig. Method for identifying residues amenable to substitution in a humanized 10D5 variable framework region and use of the variable sequence to produce a three dimensional image of 10D5 Ig.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

International Application No. PCT/US 01 A6587

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 69,70,144,145

Present claims 69,70,144,145 relate to an extremely large number of possible products. In fact, the claims contain so many possible variants that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has not been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International Application No
PCT/US 01/46587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/18 A61P25/28 A61K39/395 C12N15/13 C12N15/85 C12N5/10

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 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)
CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARD F ET AL: "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease." NATURE MEDICINE. UNITED STATES AUG 2000, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 916-919, XP002227088 ISSN: 1078-8956 abstract page 918; table 1	1-68, 71-143, 146-158
X	WO 00 23082 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD., ISRAEL) 27 April 2000 (2000-04-27) figure 9	63,138

-/—

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 April 2003	17/04/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	COVONE-VAN HEES, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199534 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-261292 XP002227089 & JP 07 165799 A (ASAHI BREWERIES LTD), 27 June 1995 (1995-06-27) abstract	65,140
X	FRENKEL D ET AL: "HIGH AFFINITY BINDING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE SEQUENTIAL EPITOPE EFRH OF BETA-AMYLOID PEPTIDE IS ESSENTIAL FOR MODULATION OF FIBRILLAR AGGREGATION" JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 95, 1999, pages 136-142, XP001001345 ISSN: 0165-5728 page 141, right-hand column, line 10-25 abstract	84-120, 122-137, 142,143, 146-154, 157,158
P,X	WO 00 72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 December 2000 (2000-12-07) page 3, line 24-31 page 19, line 20-24 page 21, line 20 -page 22, line 34 examples 11,12	1-68, 71-83, 138-141, 149,155, 156
E	WO 02 088306 A (LILLY CO ELI ;TSURUSHITA NAOYA (US); VASQUEZ MAXIMILANO (US)) 7 November 2002 (2002-11-07) page 2, line 5 -page 3, line 6 page 21, line 32 -page 22, line 23 claims	1-68, 71-83, 138-141, 149,155, 156
E	WO 02 088307 A (LILLY CO ELI ;HINTON PAUL ROBERT (US); VASQUEZ MAXIMILANO (US)) 7 November 2002 (2002-11-07) page 2, line 17 -page 3, line 16 page 20, line 10-15 example 1	84-137, 142,143, 146-154, 157,158

-/—

International Application No
PCT/US 01/46587

1925

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KETTLEBOROUGH C A ET AL: "HUMANIZATION OF A MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY BY CDR-GRAFTING: THE IMPORTANCE OF FRAMEWORK RESIDUES ON LOOP CONFORMATION" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 4, no. 7, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 773-783, XP002048549 ISSN: 0269-2139 the whole document	1-68, 71-143, 146-158

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/46587

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0023082	A	27-04-2000	CA	2354862 A1	27-04-2000
			EP	1150688 A1	07-11-2001
			WO	0023082 A1	27-04-2000
JP 7165799	A	27-06-1995	NONE		
WO 0072880	A	07-12-2000	AU	5303100 A	18-12-2000
			BG	106241 A	30-08-2002
			BR	0011000 A	19-02-2002
			CN	1359301 T	17-07-2002
			CZ	20013824 A3	13-11-2002
			DE	10084643 T0	11-07-2002
			EE	200100626 A	17-02-2003
			EP	1185298 A2	13-03-2002
			GB	2368794 A	15-05-2002
			HU	0201250 A2	28-08-2002
			NO	20015773 A	25-01-2002
			SK	16982001 A3	06-11-2002
			TR	200103447 T2	22-04-2002
			TR	200202231 T2	21-11-2002
			WO	0072880 A2	07-12-2000
WO 02088306	A	07-11-2002	WO	02088306 A2	07-11-2002
WO 02088307	A	07-11-2002	WO	02088307 A2	07-11-2002

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For Receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

193
194

Applicant's or agent's file reference: *(if desired) (12 characters maximum)* ELN-002PC

Box No. I TITLE OF INVENTION

HUMANIZED ANTIBODIES THAT RECOGNIZE BETA AMYLOID PEPTIDE

Box No. II APPLICANT

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

NEURALAB LIMITED
102 St. James Court
Flatts Smith FL04
BERMUDA

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State *(i.e. country)* of nationality: **BM**

State *(i.e. country)* of residence: **BM**

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

BASI, Guriq
514 Rhoades Drive
Palo Alto, California 94303
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(i.e. country)* of nationality: **US**

State *(i.e. country)* of residence: **US**

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

Mandragouras, Amy E.
Lahive & Cockfield, LLP
28 State Street
Boston, Massachusetts 02109
United States of America

Telephone No. (617) 227-7400

Facsimile No. (617) 742-4214

Teleprinter No.

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

SALDANHA, Jose
22A Lincoln Way
Enfield, Middlesex EN1 1TE
United Kingdom

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(i.e. country)* of nationality: **UK**

State *(i.e. country)* of residence: **UK**

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

YEDNOCK, Ted
184 Arroyo Road
P.O. Box 831
Forest Knolls, California 94933
United States of America

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(i.e. country)* of nationality: **US**

State *(i.e. country)* of residence: **US**

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(i.e. country)* of nationality:

State *(i.e. country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(i.e. country)* of nationality:

State *(i.e. country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

145
196

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) *(mark the applicable check-boxes; at least one must be marked)*:

Regional Patent

☒ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZM Zambia, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

☒ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*.....

National Patent *(if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)*:

☒	AE	United Arab Emirates	☒	LR	Liberia
☒	AG	Antigua and Barbuda	☒	LS	Lesotho
☒	AL	Albania	☒	LT	Lithuania
☒	AM	Armenia	☒	LU	Luxembourg
☒	AT	Austria	☒	LV	Latvia
☒	AU	Australia	☒	MA	Morocco
☒	AZ	Azerbaijan	☒	MD	Republic of Moldova
☒	BA	Bosnia and Herzegovina	☒	MG	Madagascar
☒	BB	Barbados	☒	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia
☒	BG	Bulgaria	☒	MN	Mongolia
☒	BR	Brazil	☒	MW	Malawi
☒	BY	Belarus	☒	MX	Mexico
☒	CA	Canada	☒	NO	Norway
☒	CH and LI	Switzerland and Liechtenstein	☒	NZ	New Zealand
☒	CN	China	☒	PL	Poland
☒	CR	Costa Rica	☒	PT	Portugal
☒	CU	Cuba	☒	RO	Romania
☒	CZ	Czech Republic	☒	RU	Russian Federation
☒	DE	Germany	☒	SD	Sudan
☒	DK	Denmark	☒	SE	Sweden
☒	DM	Dominica	☒	SG	Singapore
☒	DZ	Algeria	☒	SI	Slovenia
☒	EE	Estonia	☒	SK	Slovakia
☒	ES	Spain	☒	SL	Sierra Leone
☒	FI	Finland	☒	TJ	Tajikistan
☒	GB	United Kingdom	☒	TM	Turkmenistan
☒	GD	Grenada	☒	TR	Turkey
☒	GE	Georgia	☒	TT	Trinidad and Tobago
☒	GH	Ghana	☒	TZ	United Republic of Tanzania
☒	GM	Gambia	☒	UA	Ukraine
☒	HR	Croatia	☒	UG	Uganda
☒	HU	Hungary	☒	US	United States of America
☒	ID	Indonesia	☒	UZ	Uzbekistan
☒	IL	Israel	☒	VN	Viet Nam
☒	IN	India	☒	YU	Yugoslavia
☒	IS	Iceland	☒	ZA	South Africa
☒	JP	Japan	☒	ZM	Zambia
☒	KE	Kenya	☒	ZW	Zimbabwe
☒	KG	Kyrgyzstan			
☒	KP	Democratic People's Republic of Korea			
☒	KR	Republic of Korea			
☒	KZ	Kazakstan			
☒	LC	Saint Lucia			
☒	PH	Phillipines			
☒	GQ	Equatorial Guinea			
☒	LK	Sri Lanka			

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

☒	MZ	Mozambique	☒	OM	Oman
☒	BZ	Belize			
☒	CO	Colombia			
☒	EC	Ecuador			

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. *(Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)*

1996
197

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet need not be included in the request.*

Continuation of Box IV

Agent:

COCKFIELD, James E.
SMURZYNSKI, Thomas V.
LOREN, Ralph A.
DECONTI, Jr., Giulio A.
LYNCH, Jeremiah
HAMMITTE, Ann Lamport
HANLEY, Elizabeth A.
MANDRAGOURAS, Amy E.
LAURENTANO, Anthony A.
REMILLARD, Jane E.
CANNING, Kevin J.
SMITH, DeAnn F.
LAURO, Peter C.
DiGIORGIO, Jeanne M.
WILLIAMS, Megan E.
MILASINCIC, Debra J.
RIKKERS, David J.
BURNS, David R.
DETWEILER, Sean S.
STECHER, Peter S.
KANIK, Cynthia L.
WEST, Theadore R.
HUFF, Shayne Y.
RUSSELL, Hathaway P.
KO, Daniel B.

Limited Recognition Under 37 C.F.R. §10.9(b):

LACCOTRIPE, Maria C.

The above attorneys and agents are members of the firm of Lahive & Cockfield, LLP. Address, telephone number, facsimile number and teleprinter number of all are indicated in Box IV.

and to:

Jean M. Duvall
Dianna DeVore
Nina M. Ashton
J. Mark Hoch

of: ELAN PHARMACEUTICALS, INC., 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America.

197
1A

Box No. VI PRIORITY CL YI ☐ Further priority cl are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is: national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 06 December 2000 (06.12.00)	60/251,892	US		
item (2)				

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office)* identified above as item(s): (1)

**Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.*

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):*

ISA /EP

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):*

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request	:	5
description (excluding sequence listing part)	:	114
claims	:	25
abstract	:	1
drawings	:	10
sequence listing part of description	:	21
Total number of sheets	:	176

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☐ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☒ nucleotide and/or amino acid sequence listing and diskette in computer readable form
9. ☒ other (*specify*): Transmittal Letter; and Return Postcard.

Figure of the drawings which should accompany the abstract: NONE

Language of filing of the international application: ENGLISH

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

For NEURALAB LIMITED, *et al.*

Debra J. Milasincic

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MANDRAGOURAS, Amy, E.
Lahive & Cockfield, LLP
28 State Street
Boston, MA 02109
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 26 February 2002 (26.02.02)	
Applicant's or agent's file reference ELN-002PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US01/46587	International filing date (day/month/year) 06 December 2001 (06.12.01)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 06 December 2000 (06.12.00)
Applicant NEURALAB LIMITED et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.

3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 Dece 2000 (06.12.00)	60/251,892	ENTERED	05 Febr 2002 (05.02.02)

RECEIVED
LAHIVE & COCKFIELD
DOCKET DEPT.
MAR - 6 2002
RETRIEVED: 3/7 3/19
FORWARDED:

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

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer
Taïeb AKREMI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:
MANDRAGOURAS, Amy, E.
Lahive & Cockfield, LLP
28 State Street
Boston, MA 02109
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)	
13 June 2002 (13.06.02)	
Applicant's or agent's file reference	**IMPORTANT NOTICE**
ELN-002PC	

International application No.	International filing date (day/month/year)	Priority date (day/month/year)
PCT/US01/46587	06 December 2001 (06.12.01)	06 December 2000 (06.12.00)

Applicant
NEURALAB LIMITED et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
   KP,KR,US

   In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
   AE,AG,AL,AM,AP,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EC, EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA, MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,

   The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 48.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
   13 June 2002 (13.06.02) under No. WO 02/46237

4. TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into national phase

   The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of the designated Office. For further details, see PCT Gazette No.44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

   In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20,21,30 or 31 months , or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette, the PCT Newsletter and the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   For filing a demand for international preliminary examination, see the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Only an an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II.)

   It is the applicant's sole responsibility to monitor all these limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer
J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.91.11

ENTERED RECEIVED
LAHIVE & COCKFIELD
DOCKET DEPT.
JUN 24 2002
RETRIEVED: 7/7 4897033
FORWARDED: 7/8/02

ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN EL PÉPTIDO AMILOIDEO BETA

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud de patente provisional presentada con anterioridad US Serie No. 60/251,892 (presentada el 6 de diciembre del 2000) titulada "Anticuerpos Humanizados Que Reconocen el Péptido Amiloideo Beta". El contenido de la solicitud antes mencionada se incorpora aquí como referencia.

Antecedentes de la Invención

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad progresiva que trae como resultado la demencia senil. *Ver en general* Selkoe, *TINS* 16:403 (1993); Hardy et al., WO 92/13069; Selkoe, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:438 (1994); Duff et al., *Nature* 373:476 (1995); Games et al., *Nature* 373:523 (1995). De manera general, la enfermedad se clasifica dentro de dos categorías: inicio tardío, que ocurre en la edad avanzada (65 + años) e inicio temprano, el cual se desarrolla bastante antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y 60 años. En ambos tipos de enfermedad, la patología es la misma pero las anormalidades tienden a ser más severas y abundantes en los casos que se inician a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones cerebrales, enredos neurofibrilares y placas seniles. Los enredos neurofibrilares son depósitos intracelulares de microtúbulos asociados a la proteína tau que constan de dos filamentos enrollados uno sobre otro en parejas. Las placas seniles (es decir, placas amiloideas) son áreas de neuropil desorganizado de hasta 150 µm a través con depósitos amiloideos extracelulares en el centro que son visibles al análisis microscópico sobre secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas amiloideas se encuentra asociada también con el síndrome de Down y otros desórdenes cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido denominado péptido Aβ o β-amiloideo. El péptido Aβ es un fragmento interno 4-kDa de aminoácidos 39-43 de una transmembrana glicoproteica mayor denominada proteína precursora amiloidea (APP). Como resultado de un procesamiento proteolítico de APP mediante diversas enzimas de la secretasa, el Aβ se encuentra primordialmente en dos formas una corta, un aminoácido 40 de longitud, y una forma larga que va de aminoácidos 42-43 de longitud. Parte del dominio de la transmembrana hidrófoba del APP se encuentra en el extremo carboxico de Aβ, y podría explicar la habilidad del Aβ para agregarse y formar placas, particularmente en el caso de la

07.625

forma larga. La acumulación de placas amiloideas en el cerebro conduce, a la larga, a la muerte de células neuronales. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioración neural caracterizan a la enfermedad de Alzheimer.

Se ha podido correlacionar diversas mutaciones de la proteína APP con la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Ver, Goate et al., *Nature* 349:704 (1991) (valina^{717} a isoleucina); Charlie Harlan et al. *Nature* 353:844 (1991) (valina^{717} a glicina); Muriel et al. *Science* 254:97 (1991) (valina^{717} a fenilalanina); Mullan et al., *Nature Genet.* 1:345 (1992) (una doble mutación que transforma lisina^{595} - metionina^{596} en asparagina^{595} - leucina^{596}). Se cree que dichas mutaciones causan la enfermedad de Alzheimer mediante un procesamiento aumentado o alterado de APP hacia Aβ, en particular el proceso de APP hacia cantidades aumentadas de la forma larga de Aβ (es decir, Aβ1-42 y Aβ1-43). Se cree que las mutaciones de otros genes, tales como los genes presenilina, PS1 y PS2, afectan indirectamente el proceso de APP para generar cantidades aumentadas de la forma larga de Aβ (ver Hardy, *TINS* 20: 154 (1997)).

Se ha usado con éxito modelos sobre ratas para determinar la significación de las placas amiloideas en la enfermedad de Alzheimer (Games et al. *Supra* , Johnson-Wood et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550 (1997). En particular, cuando a los ratones transgénicos PDAPP (los cuales expresan una forma mutante del APP humano y que desarrollan la enfermedad de Alzheimer a una edad temprana), se les inyecta la forma larga de Aβ, muestran tanto una disminución en el progreso del Alzheimer como un aumento en títulos anticuerpos contra el péptido Aβ (Schenk et al., *Nature* 400, 173 (1999). Las observaciones que se discuten arriba indican que el Aβ, en particular su forma larga, es un elemento causante en la enfermedad de Alzheimer.

McMichael, EP 526,511, propone la administración de dosis homeopáticas (menos o igual a 10^{-2} mg/día) de Aβ a pacientes con Alzheimer preestablecido. En un humano típico con alrededor de 5 litros de plasma, podría esperarse que incluso el límite superior de esta dosificación genere una concentración no mayor a 2 pg/ml. La concentración normal de Aβ en el plasma humano se encuentra típicamente dentro del rango de 50-200 pg/ml: (Seubert et al., *Nature* 359:325 (1992)). Debido a que la dosis propuesta en EP 526,511 difícilmente alteraría el nivel de Aβ endógeno circulando y debido a que EP 526,511 no recomienda el uso de un adyuvante, como un inmuno-estimulante, parece poco probable que resulte beneficio terapéutico alguno.

En consecuencia, existe la necesidad de nuevas terapias y reagentes para el tratamiento de la enfermedad de

Alzheimer, en particular, terapias y reagentes capaces de efectuar un beneficio terapéutiço en dosis fisiológicas (es decir: no tóxicas).

Resumen de la Invención

La presente invención presenta nuevos reagentes inmunológicos, en particular, anticuerpos reagentes terapéuticos para la prevención y el tratamiento de las enfermedades amiloideogénicas (por ejemplo la enfermedad de Alzheimer). La invención se basa al menos en parte en la identificación y caracterización de dos anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al péptido Aβ y son efectivos en la reducción de la carga de placa y/o en la reducción de la distrofia neurítica asociada con los desordenes amiloideogénicos. El análisis estructural y funcional de estos anticuerpos nos lleva al diseño de diversos anticuerpos humanizados para uso profiláctico y/o terapéutico. En particular, la invención presenta la humanización de las regiones variables de estos anticuerpos y en consecuencia provee una inmunoglobina humanizada o cadenas anticuerpos inmunoglobulinas intactas humanizadas o anticuerpos, y inmunoglobulina funcional o fragmentos de anticuerpos, en particular, los fragmentos que se unen a los antígenos de los anticuerpos presentados.

Los polipéptidos que comprenden las regiones de determinación de complementariedad de los anticuerpos monoclonales que se presentan también se explican, así como son los reagentes polinucleótidos, los vectores y los portadores adecuados para codificar dichos polipéptidos.

Los métodos de tratamiento de las enfermedades o desordenes amiloideogénicos (por ejemplo la enfermedad de Alzheimer) se describen, ya que son composiciones farmacéuticas y conjuntos para usar en dichas aplicaciones.

También se presentan métodos para identificar residuos con los anticuerpos monoclonales que se presentan que son importantes para la apropiada función inmunológica y para identificar residuos que son sujetos de substitución en el diseño de anticuerpos humanizados que tengan una afinidad de unión mejorada y/o que tengan una inmunogenicidad reducida, cuando se usan como reagentes terapéuticos.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la cadena ligera del ratón 3D6, el humanizado 3D6, el Kabat 109230 y la línea de

germinación A19. Las regiones CDR son indicadas con flechas.

La figura 2 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de anticuerpos de cadena pesada del ratón 3D6, el humanizado 3D6, el Kabat 045919 y la línea de germinación VH3-23. Las regiones CDR son indicadas con flechas.

La figura 3 muestra gráficamente las propiedades de unión del Aβ del 3D6, el quimérico 3D6 y el 10D5. La figura 3A es una gráfico que muestra la unión de Aβ al quimérico 3D6 (PK1614) en comparación al murina 3D6. La figura 3B es un gráfico que muestra la competencia del 3D6 biotinilado contra el 3D6 no titulado, Pk1614 y 10D5 en su unión al Aβ.

La figura 4 muestra un modelo homológico del 3D6VH y VL, que muestra trazas del núcleo de α-carbono. VH se muestra línea punteada y VL se muestra línea sólida. Las regiones CDR se indican en forma de cinta.

La figura 5 muestra gráficamente las propiedades de unión Aβ del quimérico 3D6 y del humanizado 3D6. La figura 5A muestra los resultados de ELISA midiendo la unión del 3D6v1 humanizado y el quimérico 3D6 al acumulado Aβ. La figura 5B muestra los resultados de ELISA midiendo la unión del 3D6v1 humanizado y el humanizado 3D6v2 al acumulado Aβ.

La figura 6 es un gráfico que muestra las cantidades de unión del 3D6 humanizado y del 3D6 quimérico a las placas Aβ de secciones cerebrales de ratones PDAPP.

La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva que prueba la habilidad de las versiones 1 y 2 del 3D6 humanizado, el 3D6 quimérico, la murina 3D6 y el 10D5 para competir con la murina 3D6 en la unión al Aβ.

La figura 8 muestra gráficamente un ensayo de fagocitosis ex vivo que prueba la habilidad del 3D6 humanizado, el 3D6 quimérico y el IgG humano para intermediar en la reposición de Aβ por medio de las celdas microgliales.

La figura 9 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos 10D5VL y 3D6VL. Las partes en negrita indican residuos que coinciden con 10D5 VL exactamente.

La figura 10 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos 10D5VH y 3D6VH. Las partes en negrita indican residuos que coinciden con 10D5 VL exactamente.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención presenta nuevos reagentes inmunológicos y métodos para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloideogénicas. La invención se basa, al menos en parte, en la caracterización de dos inmunoglobulinas monoclonales, 3D6 y 10D5, efectivas en

unirse a la proteína beta amiloide (Aβ) (por ejemplo la unión soluble y/o acumulada Aβ), la fagocitosis mediana (por ejemplo de Aβ acumulada), la reducción de la carga de placa y/o la reducción de la distrofia neurítica (por ejemplo en los pacientes). La invención se basa además en la determinación y caracterización estructural de las estructuras primaria y secundaria de las cadenas variables ligera y pesada de estas inmunoglobulinas y la identificación de residuos importantes para la actividad y la inmunogenicidad.

Las inmunoglobulinas se presentan incluyendo una variable de cadena ligera y/o una variable de cadena pesada de las inmunoglobulinas monoclonales preferidas que se describen aquí. Las inmunoglobulinas preferidas, por ejemplo, las inmunoglobulinas terapéuticas, se presentan incluyendo una variable humanizada ligera y/o una variable humanizada pesada. Las cadenas preferidas de variable ligera y/o variable pesada incluyen una regiones de determinación de complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina monoclonal (por ejemplo la inmunoglobulina del donante) y áreas variables substancialmente de la inmunoglobulina del receptor humano. La frase "substancialmente de la inmunoglobulina del receptor humano" significa que la mayoría o los mas importantes residuos son de la secuencia del humano que recibe, permitiendo sin embargo, la substitución de residuos en ciertas posiciones con residuos seleccionados para mejorar la actividad de la inmunoglobulina humanizada (por ejemplo alterar la actividad de manera de que más cercanamente imite la actividad de la inmunoglobulina del donante) o seleccionados para disminuir la inmunogenicidad de la inmunoglobulina humanizada.

En una realización, la invención presenta cadenas de inmunoglobulina humanizada ligeras o pesadas que incluyen la regiones de determinación de complementariedad variable 3D6 (CDRs) (por ejemplo CDRs de la cadena variable ligera en la región de la secuencia que se presenta como SEQ ID NO:2 o de la secuencia de la región variable de la cadena que se presenta como SEQ ID NO:4), e incluye regiones variables de la secuencia de la cadena de la inmunoglobulina ligera o pesada de un receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo sea substituido con el residuo de aminoácido correspondiente del ratón 3D6 en su secuencia de cadena pesada o ligera, donde el residuo se selecciona del grupo que consta de (a) un residuo que se una de manera no covalente al antígeno directamente; (b) un residuo adyacente a un CDR; (c) un residuo que interactúa con un CDR(por ejemplo identificado al moldear la cadena ligera o pesada sobre la estructura resuelta de una inmunoglobulina conoci-

da homologa); y (d) un residuo que participe en la interfase VL-VH.

En otra realización, la invención presenta una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye las regiones variables CDRs del 3D6 y las regiones variables de la secuencia de una cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina de un receptor humano, siempre y cuando que al menos un cuadro del residuo sea substituido con el residuo de aminoácido correspondiente de la secuencia variable de la cadena ligera o pesada del ratón 3D6, donde el cuadro del residuo es un residuo capaz de afectar la conformación de la región variable de la cadena ligera o de funcionar como se identifica por medio del análisis de un modelo tridimensional de la región variable, por ejemplo un residuo capaz de interactuar con un antígeno, un residuo cercano al sitio de unión de un antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo adyacente a una CDR, un residuo dentro de 6 A de un residuo CDR, un residuo canónico, un residuo de zona venier, un residuo de empaque intercadenas, un residuo inusual, un residuo de un sitio glicosiliaton sobre la superficie del modelo estructural.

En otra presentación, la invención presenta una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada que incluye CDRs de región variable 3D6 (por ejemplo de la secuencia de la región variable de la cadena ligera 3D6 que se presenta como SEQ ID NO:2), e incluye una región variable de la inmunoglobulina de un receptor humano, siempre y cuando que al menos un cuadro del residuo del grupo sea seleccionado del grupo que consta de L1, L2, L36 y L46 (convención numérica de Kabat) y que sea substituido con el correspondiente residuo de aminoácido de la secuencia variable de la cadena ligera del ratón 3D6. En otra realización, la invención presenta una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada que incluye regiones variables CDRs 3D6 (por ejemplo de la secuencia variable de la cadena pesada 3D6 que se presenta como SEQ ID NO:4), e incluye una región variable de la inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un cuadro de residuo seleccionado del grupo que consta de H49, 493 y H94 (convención numérica de Kabat) sea substituida con el correspondiente residuo de aminoacidote la secuencia variable de la cadena pesada del ratón 3D6.

Las cadenas ligeras que se prefiere incluyen las regiones de cuadro kappa II del subtipo kappa II (la convención Kabat), por ejemplo, las regiones de la inmunoglobulina del receptor Kabat 019230, Kabat 005131, Kabat 005058, Kabat 005057, Kabat 005059, Kabat U21040 y Kabat U41645. Las cadenas pesadas que se prefiere incluyen regiones de cuadro del subtipo III (la convención Kabat), por ejemplo,

regiones de cuadro de la inmunoglobulina del receptor Kabat 045919, Kabat 000459, Kabat 000553, Kabat 000386 y Kabat M23691.

En otra realización, la invención presenta, además de las substituciones escritas anteriormente, la substitución de al menos un cuadro de residuo inusual humano. Por ejemplo, un residuo inusual podría ser substituido con un residuo de aminoácido que es común para la secuencia humana variable en esa posición. Alternativamente, un residuo inusual podría ser substituido con un residuo de aminoácido correspondiente de una secuencia de cadena variable de una línea de germinación homologa (por ejemplo el residuo de un cuadro de una cadena ligera inusual podría ser substituido con el residuo de una línea de germinación correspondiente de un A1, A17, A18, A2 o A19 de la secuencia del inmunoglobulina línea de germinación o un residuo del cuadro de cadena pesada inusual podría ser substituido con un residuo de línea de germinación correspondiente de un VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 o VH3-11 de la secuencia de inmunoglobulina línea de germinación).

En otra presentación, la invención presenta una inmunoglobulina humanizada que incluye una cadena ligera y una cadena pesada, como se describe anteriormente, o un fragmento que se une al antígeno de dicha inmunoglobulina. En una realización de ejemplo, la inmunoglobulina humanizada se une (es decir en las uniones específicas) al péptido beta amiloide (Aβ) con una afinidad de unir de al menos 10^{-7} M, 10^{-8}M, o 10^{-9}M. En otra realización, la inmunoglobulina o el fragmento de unión antígeno incluye una cadena pesada que tiene un isotipo γ1. En otra realización, la inmunoglobulina o el fragmento de unión antígeno se une (la unión específica) tanto al péptido amiloide beta soluble (Aβ) y al acumulado Aβ. En otra realización, la inmunoglobulina o el fragmento de unión antígeno se intermedia la fagocitosis del péptido beta amiloide (Aβ). En aún otra realización, la inmunoglobulina o el fragmento de unión antígeno cruza la barrera sangre-cerebro de un sujeto. En otra realización más, la inmunoglobulina o los fragmentos de unión antígeno reducen tanto la carga del péptido beta amiloide (Aβ) y la distrofia neurítica de un sujeto.

En otra realización, la invención presenta inmunoglobulinas quiméricas que incluyen regiones variables 3D6 (por ejemplo las secuencias de región variable presentadas como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4). En otra realización más, la invención presenta una inmunoglobulina o un fragmento de unión antígena de la misma, que incluye una región de cadena pesada variable como se presenta en SEQ ID NO:8 y una región de cadena ligera variable como se presenta en SEQ ID

NO:5. En otra realización más, la invención presenta una inmunoglobulina o un fragmento de unión antígena de la misma, que incluye una región de cadena variable pesada como se presenta en SEQ ID NO:12 y una región de cadena ligera variable como se presenta SEQ ID NO:11. En otra realización mas, la inmunoglobulina; o el fragmento de unión antígena de la misma incluye además regiones constantes del IgG1.

Las inmunoglobulinas descritas aquí son particularmente adecuadas para usar en los métodos terapéuticos que apuntan a la prevención o tratamiento de enfermedades amiloideogénicas. En una realización la invención presenta un método de prevenir o tratar una enfermedad amiloideogénica (por ejemplo la enfermedad de Alzheimer) que involucra la administración al paciente de una dosis efectiva de una inmunoglobulina humanizada como se describe aquí. En otra realización la invención presenta composiciones farmacéuticas que incluyen una inmunoglobulina como se describe aquí y un portador farmacéutico. También se presentan moléculas de ácido nucleico aisladas, vectores y celdas de portadora para producir la inmunoglobulina o los fragmentos de inmunoglobulina o las cadenas descritas aquí, así como los métodos para producir dichas inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulinas o cadenas de inmunoglobulinas.

La presente invención presenta además un método para identificar los residuos de 3D6 que pueden substituirse cuando se produce una inmunoglobulina 3D6 humanizada. Por ejemplo un método para identificar los residuos de la región variable que pueden ser substituidos involucra moldear la estructura tridimensional de la región variable 3D6 sobre una estructura no resuelta de inmunoglobulina homóloga y analizar dicho modelo para ubicar residuos capaces de afectar la conformación de la región variable de la inmunoglobulina 3D6 o sus funciones, de manera que los residuos que son substituibles se identifican. La invención presenta además el uso de la secuencia de la región variable que se presenta como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o cualquier porción de la misma, para la producción de una imagen tridimensional de una inmunoglobulina 3D6, una cadena de inmunoglobulina 3D6, o el dominio de la misma.

Antes de describir la invención sería de mucha ayuda entender las definiciones que se presentan para ciertos términos que se usarán de aquí en adelante.

El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" (que se usa de manera intercambiable aquí) se refiere a una proteína con capacidad de unirse a los antígenos que tiene como estructura básica una cadena de cuatro polipéptidos que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enla-

ces de intercadena de disulfido, que tiene la habilidad de unirse específicamente a los antígenos. Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden existir en forma monomérica o polimérica. El término "fragmento de unión antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o que compite con anticuerpos intactos (es decir con el anticuerpo intacto del cual ellos han derivado) para unirse al antígeno (es decir la unión específica).

"La unión específica" de un anticuerpo significa que el anticuerpo exhibe una apreciable afinidad para el antígeno o el epitope preferido y, de preferencia, no exhibe una reactividad cruzada significante. El "apreciable" o preferido en el caso de la unión incluye a la unión como una afinidad de al menos 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} M o 10^{-10} M. Afinidades mayores a 10^{-7}, de preferencia mayores que 10^{-8} M son mas preferidas. Los valores intermedios de aquellos que se presenta aquí también se intenta que estén dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida podría estar indicada como un rango de afinidades, por ejemplo, 10^{-6} hasta 10^{-10} M, de preferencia 10^{-7} hasta 10^{-10} M, de mayor preferencia 10^{-8} a 10^{-10} M. Un anticuerpo que "no exhibe reactividad cruzada significante" es uno en el cual de manera apreciable no se nota una unión a una entidad no deseada (por ejemplo una entidad proteínacea no deseable). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente al Aβ se unirá apreciablemente al Aβ pero no reaccionará significativamente con proteínas que no sean Aβ o péptidos que no sean Aβ (por ejemplo las proteínas o péptidos no Aβ que se incluyen en las placas). Un anticuerpo específico para un epítope preferido, por ejemplo, no reaccionará de manera cruzada significativamente con epítopes remotos de la misma proteína o péptido. La unión específica se puede determinar de acuerdo a cualquier medio reconocido en este campo para determinar tal unión. De preferencia, la unión específica se determina de acuerdo con análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

Los fragmentos de unión se producen por técnicas de recombinación de ADN, o por enclave enzimático o químico de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv, cadenas simples, y anticuerpos de cadena simple. Excepto por las inmunoglobulinas o anticuerpos "biespecíficas" o "bifuncionales", una inmunoglobulina o anticuerpo se entiende como uno que tiene su punto de unión idénticos. Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas diferentes pesado y ligero y dos puntos de unión distintos. Los anticuerpos biespecíficos pue-

den ser producidos por una diversidad de métodos incluyendo la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado (es decir al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir una cadena ligera o pesada) que tiene una región variable que incluye una región de cuadro variable substancialmente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones de determinación de complementariedad (CDRs) (por ejemplo por lo menos un CRD, de preferencia dos CRDs, de mas preferencia tres CRDs) substancialmente a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina no humano, y que además incluye regiones constantes (por ejemplo al menos una región constánte o una porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y de preferencia tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo "cadena ligera de región variable humanizada" o "cadena pesada de región variable humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de cuadro variable substancialmente a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina humana y regiones de determinación de complementariedad (CDRs) substancialmente a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina no humano.

La frase "substancialmente a partir de un anticuerpo o inmunoglobulina humana" o "substancialmente humana" significa que cuando se alinea a una inmunoglobulina humana o secuencia de anticuerpo amino con el propósito de comparación, la región comparte al menos 80-90%, de preferencia 90-95%, de más preferencia 95-99% de identidad (es decir identidad de secuencia local) con el cuadro humano o secuencia de región constante, permitiendo por ejemplo, substituciones conservativas, substituciones de consenso de secuencia, substituciones de línea de germinación, mutaciones regresivas, y similares. La introducción de substituciones conservativas, substituciones de consenso de secuencia, substituciones de línea de germinación, mutaciones regresivas, y similares a menudo se denominan "optimización" de un anticuerpo o cadena humanizada. La frase "substancialmente a partir de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "substancialmente no humano" significa que se tiene una secuencia de anticuerpo o inmunoglobulina de al menos 80-95%,

de preferencia 90-95%, de mas preferencia, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a aquella de un organismo no humano, por ejemplo un mamífero no humano.

En consecuencia, todas las partes de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizada, o de una cadena de anticuerpo o inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente los CDRs, son substancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o mas secuencias de inmunoglobulina nativas de humano. Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no incluyen inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define más adelante.

El término "identidad significativa" significa que dos secuencias de polipéptido, cuando están alineadas óptimamente, tales como lo hacen los programas GAP o BESTFIT que usan el espacio de pesos por defecto, comparten al menos 50-60% de identidad de la secuencia, de preferencia 60-70% de identidad de la secuencia, de mayor preferencia 70-80% de identidad de la secuencia, aún mas preferible de al menos 80-90% de identidad, aún mas preferible al menos 90-95% de identidad, y aún mas preferible al menos 95% de identidad de secuencia o mas (por ejemplo 99% de identidad de secuencia o mas). El término "identidad substancial" significa que dos secuencias de polipéptidos, cuando se alinean óptimamente, tal como lo hacen los programas GAP o BESTFIT que usan la distancia de pesos por defecto, comparten al menos 80-90% de identidad de secuencia, de preferencia 90-95% de identidad de secuencia, y de mayor preferencia al menos 95% de identidad de secuencia o mas (por ejemplo 99% de identidad de secuencia o mas). Para la comparación de secuencias, de manera típica una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la cual las secuencias en prueba son comparadas. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de referencia y de prueba son colocadas dentro de una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros del programa diseñado. Los términos "identidad significativa" y "identidad de secuencia" son usados de manera intercambiable aquí.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede ser conducido por ejemplo por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Match. 2:482 (1981), por el algoritmo de homología de alineamiento deNeedleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similaridad de Pearson & Lipman,

Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección visual (ver en general Ausubel et al., mas arriba). Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de la identidad de secuencia y la similaridad de secuencia es el algoritmo BLAST, el cual se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). El Software para llevar a cabo los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (accesible al público a través del servidor de internet del Instituto Nacional de la Salud NCBI). Típicamente, los parámetros por defecto del programa se pueden usar para realizar la comparación de secuencia, aunque también se puede usar parámetros personalizados. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como medida por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de resultados BLOSUM62 (ver Henikoff & henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

De preferencia, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por substitución conservativa de aminoácidos. Para los propósitos de clasificar las substituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos son agrupados como siguen: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutrales): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales acidicas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influencian la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las substituciones conservativas involucran substituciones entre aminoácidos de la misma clase. Las substituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de esas clases por un miembro de otra clase.

El término "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas cadenas liviana y pesada se derivan de diferentes especies. Se puede construir anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas, por ejemplo mediante la ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Un "antígeno" es una entidad (una entidad o péptido protenáceo) al cual se une específicamente un anticuerpo.

El término "epitope" o "antígeno determinante" se refiere a un punto en un antígeno al cual un anticuerpo o inmunoglobulina (o un fragmento de unión del antígeno del

mismo) se une específicamente. Los epitopes pueden ser formados tanto a partir de aminoácidos contiguos o de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante una capa terciaria de una proteína. Los epitopes formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos en la exposición a solventes desnaturalizantes mientras que los epitopes formados por una capa terciaria son típicamente perdidos en el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epitope típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial singular. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epitopes incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen el mismo epitope pueden ser identificados en un ensayo de inmunidad muy simple que muestra la habilidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo al antígeno objetivo, es decir un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el cual la inmunoglobulina que está bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como el Aβ. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo el radioinmunoensayo de fase sólida directa o indirecta (RIA), el inmunoensayo de enzimas de fase sólida directa o indirecta (EIA), el ensayo de competencia sándwich (ver Stahli et al., Methods in Enzimology 9:242 (1983)); el EIA de biotin-avidin de fase sólida directa (ver Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); el ensayo de titulado de fase sólida directa, el ensayo de titulado sándwich de fase sólida directa (ver Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); el RIA de título de fase sólida directa usando el titulador I-125 (ver Morel el al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); El EIA de biotin-avidin de fase sólida directa (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)); y RIA titulada directa (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). De manera típica, este tipo de ensayo involucra el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que lo contienen cualquiera de los dos, un ensayo de inmunoglobulina no titulado y una inmunoglobulina de referencia titulada. La inhibición competitiva se mide por medio de la determinación de la cantidad de título que se ha unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina que se está probando. Generalmente la inmunoglobulina que se prueba está presente en exceso. Generalmente,

cuando un anticuerpo que compite está presente en exceso, éste inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común por al menos 50 o 75%.

Un epítope también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo células B y/o células T. El reconocimiento celular de un epítope pueden ser determinados por ensayos in vitro que miden la proliferación dependiente del antígeno, como lo determina la incorporación de ^{3}H-timidina, por secreción de citosina, por secreción de anticuerpos, o por la destrucción de los antígenos dependientes (el ensayo de linfocitos T-citotóxico).

Epítopes de ejemplo o determinantes antígenos pueden ser hallados dentro de la proteína precursora amiloidea humana (APP), pero se hallan de preferencia dentro del péptido Aβ del APP. Existen muchas isoformas de APP, por ejemplo APP^{695} APP^{751} y APP^{770}. Los aminoácidos dentro del APP reciben números que se asignan de acuerdo a la secuencia de la isoforma APP^{770} (ver por ejemplo GenBank Accesión No. P05067). Aβ (al cual también nos referimos aquí como péptido beta amiloide y A-beta) péptido es un fragmento interno 4-kDa de aminoácidos 39-43 de APP (Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 y Aβ43). Aβ40 por ejemplo, consta de residuos 672-711 de APP y Aβ42 consta de residuos 673-713 de APP. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por medio de diferentes enzimas de la secretásea in vivo o in situ, Aβ se halla tanto en una "forma corta", 40 aminoácidos de longitud, y una "forma larga", que va desde 42-43 aminoácidos de longitud. Los epítopes preferidos o determinantes antígenos, como se describen acá están ubicados dentro del término N del péptido Aβ e incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 de Aβ, de preferencia los residuos 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7 de Aβ42. Los epítopes adicionales que nos hemos referido o determinantes antígenos incluyen residuos 2-6, 2-7, 2-8, 4-7 de Aβ42.

El término "enfermedad amiloideogénica" incluye cualquier enfermedad que esté asociada con (o causada por) la formación o deposición de fibrilas insolubles amiloideas. Enfermedades amiloidógenas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis sistémica, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes que empieza en la madurez, el mal de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la demencia frontotemporal y las encefalopatías esponjiformes transmisibles relacionadas al prion (las enfermedades kuru y Creutzfeldt-Jacob en humanos y la scrapie y la BSE en el ganado bovino y vacuno respectivamente). Las diferentes enfermedades amiloidógenas están definidas o caracterizadas por la naturaleza del polipéptido que compone las fibrilas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen la enferme-

dad de Alzheimer, la proteína amiloide-β (por ejemplo del tipo silvestre, variante, o truncado de la proteína β-amiloide) es el componente polipéptido que caracteriza el depósito amiloideo. En consecuencia, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una "enfermedad caracterizada por depósitos de Aβ" o una "enfermedad asociada con depósitos de Aβ", por ejemplo en el cerebro de un sujeto o paciente. Los términos "proteína amiloide-β", "péptido amiloide-β", "amiloide-β", "Aβ" y "péptido Aβ" se usan de manera intercambiable aquí.

El término "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos parcialmente lograr el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos parcialmente detener la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya está sufriendo la enfermedad. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la infección y del estado general del sistema inmunológico del paciente.

El término "paciente" incluye a los humanos y otros sujetos mamíferos que reciban tratamiento ya sea profiláctico o terapéutico soluble o disociado Aβ se refiere a un polipéptido Aβ que no está acumulado o desagregado. Insoluble Aβ se refiere a un polipéptido Aβ acumulado, por ejemplo, Aβ mantenido por enlaces no covalentes. Aβ (Aβpor ejemplo Aβ42) se cree que se acumula, al menos en parte, debido a la presencia de residuos hidrófobos del terminal C del péptido (parte del dominio de las transmembrana de APP). Un método para preparar Aβ soluble es disolver péptido liofilizado en DMSO puro con sonicación. La solución resultante es centrifugada para eliminar cualquier partícula insoluble.

I. <u>Reagentes Terapéuticos e Inmunológicos</u>

Los reagentes terapéuticos e inmunológicos de la invención comprenden o consisten inmunogenos o anticuerpos o funcionales o fragmentos de unión anfígenas de los mismos como se definen aquí. Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetramero de subunidades. Cada tetramero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipéptidas, cada par teniendo una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de entre 100 a 110 o mas aminoácidos que son responsables primordialmente por el reconocimiento de antígenos. La porción terminal-carboxy de cada cadena define una región constante que es responsable primordialmente en la función de efectuar.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o Lambda y son de alrededor de 230 residuos de longitud. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ), o epsilon (ε), son de alrededor de 450-600 residuos en longitud, y definen el isotopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Las cadenas pesadas y ligeras están dobladas en dominios. El término "dominio" se refiere a la región globular de una proteína, por ejemplo, una inmunoglobulina o anticuerpo. Los dominios de la inmunoglobulina o anticuerpo incluyen por ejemplo, 3 o 4 lazos péptidos estabilizados por una placa doblada β y un enlace de intercadenas disulfido. Las cadenas ligeras intactas tienen por ejemplo dos dominios (V_L y C_L) y las cadenas pesadas intactas tienen por ejemplo, cuatro o cinco dominios (V_H, C_H1, C_H2 y C_H3).

Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones constante y variable se encuentran unidas por una región "J" de alrededor de 12 o mas aminoácidos, donde la cadena pesada también incluye una región "D" de alrededor de 10 o mas aminoácidos. (Ver generalmente, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)), Ch. 7, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos sus propósitos).

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el punto de unión del anticuerpo. Por lo tanto un anticuerpo intacto tiene dos puntos de unión. Excepto en los anticuerpo bifuncionales o biespecíficos, los dos puntos de unión son los mismos. Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones de cuadro relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones de determinación de complementariedad o CDRs. Los CDRs de las dos cadenas de cada par están alineados por las regiones de cuadro permitiendo la unión a un epítope específico. Del N terminal al C terminal ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. "FR4" también se denomina en el arte como la región D/J de la cadena variable pesada y la región J de la cadena variable ligera. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Rabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (Nacional Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Una definición estructural alternativa ha sido propuesta por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); y J. Mol. Biol. 186:651 (1989) (de aquí en adelante se denominarán de manera colectiva "Chothia et al." Y se incorporan como referencia en su totalidad para todos sus propósitos).

A. Aβ Anticuerpos

Los agentes terapéuticos de la invención incluyen anticuerpos que específicamente se unen a Aβ u otro componente de las placas amiloideas. Tales anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Algunos de dichos anticuerpos se unen específicamente a la forma agregada del Aβ sin unirse a la forma soluble. Algunos se unen específicamente a la forma soluble sin unirse a la forma agregada. Algunos se unen tanto a la forma agregada como a la forma soluble. Algunos de dichos anticuerpos se unen a una forma corta que ocurre en la naturaleza del Aβ (es decir Aβ39, 40 o 41) sin unirse a la forma larga de ocurrencia natural de Aβ (es decir Aβ42 y Aβ43). Algunos anticuerpos se unen a la forma larga de Aβ sin unirse a la forma corta. Algunos anticuerpos se unen a Aβ sin unirse a la proteína precursora amiloidea de longitud total. Los anticuerpos usados en los métodos terapéuticos de preferencia tienen una región constante intacta al menos suficiente de la región constante para interactuar con un receptor Fc. El isótopo humano IgG1 es preferido debido a que tiene la mayor afinidad de los sotipos humanos para el receptor FcRI en las células fagocíticas. Los fragmentos Fab biespecíficos también pueden usarse, en los cuales un brazo del anticuerpo tiene la especificidad para el Aβ y el otro para el receptor Fc. Algunos anticuerpos se unen a Aβ con una afinidad de unión mayor que (o igual a) alrededor de 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 o 10^{10} M^{-1}.

La sepa policlonal típicamente contiene poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a diversos epítopes a todo lo largo de Aβ. Sin embargo la sepa policlonal puede ser específica para un segmento particular de Aβ, tal como Aβ1-10. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítope específico dentro de Aβ que puede ser un epítope conformacional o no conformacional. La eficacia profiláctica y terapéutica de los anticuerpos puede ser analizada usando los procedimientos de modelo animal transgénico que se describen en los Ejemplos. Los anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítope dentro de los residuos 1-10 de Aβ (con el primer terminal de residuo N del Aβ natural designado 1). Algunos anticuerpos monoclonales preferidos se unen a un epítope dentro de los aminoácidos 1-5, y algunos a un epítope dentro del 5-10. Algunos anticuerpos preferidos se unen a epítopes con aminoácidos 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 o 3-7. Algunos anticuerpos preferidos se unen a un epítope que empieza en los residuos 1-3 y termina en los residuos 7-11 del Aβ. Los anticuerpos menos preferidos incluyen a aquellos que se unen a epítopes con residuos 10-15, 15-20, 25-

30, 10-20, 20, 30ª 10-25 de Aβ. SE recomienda que dichos anticuerpos sean analizados en su actividad en los ratones de modelo que se describen en los ejemplos antes de su uso. Por ejemplo se ha descubierto que ciertos anticuerpos para los epítopes dentro de los residuos 10-18, 16-24, 18-21 y 32-42 no tienen suficiente actividad. En ciertos métodos, los anticuerpos monoclonales múltiples que tienen especificidades de unión a diferentes epítopes son usados. Tales anticuerpos pueden ser administrados secuencial o simultáneamente. Los anticuerpos para los compones amiloideos que no sean el Aβ también se pueden usar (por ejemplo administrados o coadministrados). Por ejemplo los anticuerpos pueden ser dirigidos a la proteína sinucleica asociada al amiloideo.

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítope dentro de residuotes pacíficos tales como Aβ 1-5 por ejemplo, lo que quiere decir que el anticuerpo específicamente se une a un polipéptido que contiene los residuos especificados (es decir Aβ 1-5 en este ejemplo). Dicho anticuerpo no necesariamente contacta cada residuo dentro de Aβ 1-5. Tampoco cada substitución o eliminación de un aminoácido con el Aβ 1-5 afecta significativamente la afinidad de unión. La especificidad del epítope de un anticuerpo puede ser determinada por ejemplo mediante la formación de una librería de muestras de fajias en la cual diferentes elementos muestran diferentes subsecuencias de Aβ. La librería de muestras de fajias es entonces seleccionada para los miembros que específicamente se unen a un anticuerpo que se está examinando. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente dicha familia contiene una secuencia nuclear común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes o flanqueadoras en diferentes miembros. La secuencia de núcleo mas corta que muestra una unión específica al anticuerpo define el límite del epítope para el anticuerpo. Los anticuerpos también se pueden examinar para su especificidad de epítope en un ensayo de competencia con un anticuerpo cuya especificidad de epítope halla sido determinada de antemano. Por ejemplo los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 3D6 para la unión a un Aβ en el mismo o un epítope similar como el 3D6, es decir dentro de los residuos Aβ 1-5. De la misma manera los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 10D5 se unen al mismo o a un epítope similar, es decir dentro de los residuos Aβ 3-6. Los anticuerpos de filtro para la especificidad del epítope son un predictor muy usual de la eficacia terapéutica. Por ejemplo un anticuerpo determinado para unirse con un epítope dentro de residuos 1-7 de Aβ es probable que sea efectivo en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales que específicamente se unen a un segmento preferido de Aβ sin unirse a otras regiones de Aβ tienen un número de ventajas relativas con respecto a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones o la sepa policlonal para el Aβ intacto. Primero para dosificaciones de igual masa, las dosificaciones de anticuerpos que sé unen específicamente a segmentos preferidos que contienen una dosificación molar mayor de anticuerpos efectivos en la limpieza de placas amiloideas. Segundo los anticuerpos que específicamente se unen a segmentos preferidos pueden inducir a una respuesta de aclaración contra los depósitos amiloideos sin inducir una respuesta de aclaración contra los polipéptidos APP intactos, reduciendo por lo tanto lo efectos secundarios potenciales.

1.Producción de Anticuerpos no Humanos

La presente invención presenta anticuerpos no humanos, por ejemplo, anticuerpos que tienen especificidad por los epítopes preferidos Aβ de la invención. Dichos anticuerpos pueden ser usados en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o de preferencia proveer regiones de determinación de complementariedad para la producción de anticuerpos humanizados o quiméricos (que se describen en detalle más abajo). La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo de murina, cuy, primates, conejos o ratas, puede ser lograda por medio de, por ejemplo, la inmunización del animal con Aβ. Un polipéptido más largo que comprende Aβ o un fragmento inmunogénico de Aβ o anticuerpos anti-ideotípicos contra un anticuerpo del Aβ también se pueden usar. Ver Harlow & Lane, supra, (que se incorpora como referencia para todos los propósitos). Dicho inmunógeno puede ser obtenido de una fuente natural, por síntesis de péptidos o por una expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno puede ser administrado en fusión o de otra manera en un complejo que lleve un portador de proteína, como se describe mas abajo. Opcionalmente, el inmunógeno puede ser administrado con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando es administrado en conjunto con un antígeno aumenta la respuesta inmune del antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunológica por medio de diversos mecanismos que incluyen el reclutamiento de linfocitos, la estimulación de células B y/o células T, y la estimulación de macrofajias. Se puede usar diversos tipos de adyuvante como se describe mas abajo. El adyuvante

completo Freund seguido por un adyuvante incompleto se prefiere para la inmunización de los animales de laboratorio.

Los conejos o los cuyes son usados típicamente para la fabricación de anticuerpos policlonales. Una preparación de ejemplo de anticuerpos policlonales, es decir para la protección pasiva se puede llevar a cabo como sigue. 125 ratones no transgénicos son inmunizados con 100 µg Aβ1-42, mas el adyuvante CFA/IFA, y son eutanizados a los 4 o 5 meses. Se recolecta la sangre de los ratones inmunizados. Se separa el IgG de los otros componentes de la sangre. El anticuerpo específico para el inmunogeno podría ser parcialmente purificado por una cromatografía de afinidad. Un promedio de entre 0.5 a 1 mg de anticuerpo específico de inmunogeno se obtiene por ratón dando un total de 60 a 120 mg.

Los ratones se usan típicamente para hacer anticuerpos monoclonales. Los monoclonales pueden ser preparados contra un fragmento por medio de la inyección del fragmento o una forma mas larga de Aβ dentro de un ratón, la preparación de hibridomas y el filtrado de las hibridomas para buscar un anticuerpo que específicamente se una a Aβ. Opcionalmente los anticuerpos son analizados para la unión a una región específica o un fragmento deseado de Aβ sin unirse a otros fragmentos que no estén traslapados de Aβ. El último tipo de filtrado puede ser logrado por medio de la determinación de la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de eliminación de un péptido Aβ y la determinación de qúe mutante de eliminación se une al anticuerpo. La unión también se puede evaluar por ejemplo por medio de la acumulación Western o ELISA. El fragmento mas pequeño que muestra unión específica al anticuerpo define el epítope del anticuerpo. Alternativamente, la especificidad del epítope puede ser determinada por un ensayo de competencia en el cual un anticuerpo de prueba y uno de referencia compiten para unirse al Aβ. Si los anticuerpos de prueba y referencia compiten entonces ellos se pueden unir al mismo epítope o epítopes que estén suficientemente próximos de manera que la unión de un anticuerpo interfiere con la unión del otro. El isotipo preferido para dichos anticuerpos es un ratón del isotipo IgG2a o el isotipo equivalente en otras especies. El ratón isotipo IgG2a es el equivalente del isotipo humano IgG1.

2. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

La presente invención también presenta anticuerpos qùiméricos y/o humanizados (es decir inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicos para el péptido Amiloideo Beta. Los anticuerpos humanizados o quiméricos tienen la misma o similar especificidad de unión y afinidad

que un ratón u otro anticuerpo no humano que provee el material inicial para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado.

A. Producción de Anticuerpos Quiméricos

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada han sido construidos, típicamente por ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón podrían ser unidos a un segmento constante humano (C), tal como el IgG1 y el IgG4. Se prefiere el isotipo humano IgG1. Un anticuerpo quimérico típico es por lo tanto una proteína híbrida que consiste del dominio de unión del antígeno o V de un anticuerpo de ratón y el dominio de efecto o C de un anticuerpo humano.

B. Producción de Anticuerpos Humanizados

Los anticuerpos humanizados son anticuerpos que tienen residuos de cuadro de región variable substancialmente a partir de un anticuerpo humano (denominado un anticuerpo del receptor) y regiones de determinación de complementariedad substancialmente de un anticuerpo de ratón (denominado inmunoglobulina del donante) Ver, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,762, Selick et al., Wo 90/07861, y Winter, US 5,225,539 (que se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las regiones constantes, si estuvieran presente, también son substancialmente o completamente de una inmunoglobulina humana.

La substitución de CDRs de ratón dentro de un cuadro de dominio de variable humana es muy probable que resulte en la retención de su orientación espacial correcta si el cuadro del dominio de la variable humana adopta la misma o una conformación similar al cuadro variable del ratón del cual los CDRs se originaron. Esto se logra por medio de la obtención de dominios variables humanos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de cuadro exhiben un alto grado de identidad de secuencia con los dominios del cuadro de la variable de murina de los cuales se derivan los CDRs. Las regiones de cuadro de las cadenas variables pesada y ligera pueden ser derivadas de la misma o de una distinta secuencia de anticuerpo humana. La secuencia de anticuerpos humanas pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos que ocurren naturalmente o podrían ser secuencias de consenso de diversos anticuerpos humanos. Ver Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al.,

Protein Enginnering 6:971 (1993) y Carter et al., Wo 92/22653.

Habiendo identificado las regiones de determinación de complementariedad de la inmunoglobulina del donante murina y las inmunoglobulinas apropiadas del receptor humano, el siguiente paso es determinar cuales, si los hubiera, residuos de estos componentes deben ser substituidos para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado que resulta. En general, la substitución de los residuos de aminoácido humano con los de murina debe ser minimizada debido a que la introducción de residuos de murina aumenta el riesgo de que un anticuerpo provoque una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) por parte de los humanos. Métodos reconocidos en este campo para determinar la respuesta inmune se pueden llevar a cabo para monitorear la respuesta HAMA en un paciente en particular o durante los ensayos clínicos. A los pacientes a los que se les administra anticuerpos humanizados se le puede dar una evaluación de inmunogenecidad al comienzo y a través de la administración de dicha terapia. La respuesta HAMA se mide por ejemplo, mediante la detección de anticuerpos contra el reagente terapéutico humanizado, en muestra de suero del paciente usando un método conocido para todos los que trabajan en este campo, que incluyen la tecnología de resonancia del plasma superficial (BIACORE) y/o un análisis de fase sólida ELISA.

Ciertos aminoácidos de los residuos de cuadro de la región variable humana son seleccionados para la substitución basados en su posible influencia en la conformación CDR y/o su unión al antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR de murina con las regiones de cuadro de variable humana podrían traer como resultado unos frenos conformacionales no naturales, los cuales a menos que sean corregidos mediante la substitución de ciertos residuos de aminoácidos llevarían a la pérdida de la afinidad de unión.

La selección de los residuos de aminoácido para la substitución se determina en parte, mediante un modelo de computadora. El hardware y el software para computadora se describen aquí para la producción de imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina. En general, los modelos moleculares son producidos empezando a partir de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominio de las mismas. Las cadenas que se debe modelar son comparadas para buscar similaridad de secuencia de aminoácido con cadenas o dominios de estructuras solucionadas tridimensionales, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similaridad de secuencia es o son seleccionadas como punto de inicio para la construcción del modelo molecular. Las estructuras de inicio solucionadas son modificadas para

permitir que las diferencias de los aminoácidos reales en las cadenas de inmunoglobulinas o en sus dominios sean modelados y para aquellos en la estructura de inicio. Las estructuras modificadas son entonces ensambladas dentro de una inmunoglobulina compuesta. Finalmente el modelo se refina mediante la minimización de energía y mediante la verificación de que todos los átomos están dentro de las distancias apropiadas uno del otro y que las distancias de unión y los ángulos están dentro de los límites químicamente aceptables.

La selección de los residuos de aminoácido para la substitución también puede ser determinada, en parte, mediante la examinación de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de substitución o mutagenesis de aminoácidos en particular. Por ejemplo cuando un aminoácido difiere entre un residuo de cuadro de región variable y un residuo de cuadro de región variable de un humano seleccionado, el cuadro de aminoácido del humano deberá normalmente ser substituido por su cuadro equivalente de aminoácido del anticuerpo del ratón cuando se pueda esperar razonablemente que el aminoácido:

(1) se una de manera no covalente al antígeno directamente,

(2) esté adyacente a una región CDR,

(3) de otra manera interactúe con una región CDR (es decir dentro de alrededor de 3-6 Å de una región CDR como lo determina el modelo de computadora), o

(4) participe en le interfase de VL-VH.

Los residuos que se "unen de manera no covalente al antígeno directamente" incluyen aminoácidos en posiciones en regiones de cuadro que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con los aminoácidos del antígeno de acuerdo a las fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por la unión al hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, la interacción hidrófoba y similares.

Los CDR y las regiones de cuadro son como se definen en Kabat et al., o en Chotia et al., mas arriba: Cuando los residuos de cuadro, como lo define Kabat et al., mas arriba, constituyen unos residuos de lazo estructural como los define Chotia et al. mas arriba, los aminoácidos presentes en el anticuerpo del ratón pueden ser seleccionados para la substitución dentro del anticuerpo humanizado. Los residuos que están adyacentes a una región CDR incluyen residuos aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a uno o mas de los CDRs en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como lo define Kabat o a

una CDR como lo define Chotia (Ver Chotia and Lesk JMB 196:901 (1987)). Estos aminoácidos son en particular muy probable que actúen con los aminoácidos en los CDRs y si son escogidos del receptor que distorsionen los CDRs del donante y reduzcan la afinidad. Mas aún los aminoácidos adyacentes podrían interactuar directamente con el antígeno (Amit et al., Science, 233:747 (1986), la cual se incorpora aquí como referencia) y seleccionar estos aminoácidos a partir del donante podría ser deseable para mantener todos los contactos antígenos que proveen afinidad en el anticuerpo original.

Los residuos que "de otro modo interactúan con una región CDR" incluyen aquellos que son determinados por un análisis estructural secundario como que están en la orientación espacial suficiente para afectar una región CDR. En una realización, los residuos que de otra manera interactúan con una región CDR son identificados mediante el análisis de un modelo tridimensional de la inmunoglobulina del donante (por ejemplo un modelo generado por computadora). Un modelo tridimensional, típicamente del anticuerpo del donante original, muestra que cierto aminoácidos fuera de las CDRs están cercanas a las CDRs y tienen una buena probabilidad de interactúar con aminoácidos en las CDRs mediante la unión por hidrogeno, las fuerzas Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En estas posiciones de aminoácidos, el aminoácido de la inmunoglobulina del donante en lugar del aminoácido de la inmunoglobulina del receptor podría ser seleccionado. Los aminoácidos de acuerdo a este criterio generalmente tendrán un átomo de cadena lateral dentro de tres unidades ángstrom (Å) del mismo átomo en las CDRs y deberán contener un átomo que pueda interactuar con los átomos CDR de acuerdo a las fuerzas químicas establecidas tales como aquellas que se listan anteriormente.

En el caso de átomos que podrían formar una unión de hidrógeno, los 3Å se miden entre sus núcleos, pero en los átomos que no forman una unión, los 3Å se miden entre sus superficies Van der Waals. Por lo tanto en el último caso los núcleos deben estar dentro de alrededor de 6Å (3 Å mas la suma de los radios de Van der Waals) para que los átomos se consideren capaces de interactuar. En muchos casos los núcleos estarán 4 o 5 o 6Å separados. En la determinación de si un aminoácido puede interactuar con las CDRs, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos de la cadena pesada CDR 2 como parte de las CDRs, debido a que desde el punto de vista de la estructura estos 8 aminoácidos se comportan mas como parte del cuadro.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con los aminoácidos en las CDRs podrían ser identificados de otra

manera todavía. El área de la superficie accesible del solvente de cada cuadro del aminoácido se calcula de dos maneras: (1)en el anticuerpo intacto, y (2)en una molécula hipotética que consiste de un anticuerpo donde se ha quitado la CDR. Una diferencia significativa entre estos números es que alrededor de 10 angstroms cuadrados o mas demuestra que el acceso del cuadro de aminoácido al solvente es al menos parcialmente bloqueado por las CDRs, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDRs. El área de la superficie accesible del solvente de un aminoácido puede ser calculado basado en un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en esta ciencia (por ejemplo Conolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971), ambas son incorporadas aquí como referencia). Los aminoácidos de cuadro podrían también ocasionalmente interactuar con las CDRs indirectamente, afectando la conformación de otro cuadro de aminoácido que a su vez entra en contacto con las CDRs.

Se sabe que los aminoácidos en diversas posiciones del cuadro son capaces de interactuar con las CDRs en muchos anticuerpos (Chotia and Lesk, mas arriba, Chotia et al., mas arriba y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990), los cuales son incorporados aquí como referencia), de manera notable los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y el 26-30, 71 y 94 de la cadena pesad (la numeración de acuerdo a Kabat) se sabe que son capaces de interactuar con las CDRs en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también es posible que interactúen con las CDRs. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere escoger el aminoácido del donante en lugar que el aminoácido del receptor (cuando son diferentes) para que estén en la inmunoglobulina humanizada. Por otra parte, ciertos residuos capaces de interactuar con la región CDR, tales como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, podrían a veces ser escogidos de la inmunoglobulina del receptor sin perder la afinidad en la inmunoglobulina humanizada.

Los residuos que "participan en la interfase VL-VH" o "residuos de empaque" incluyen aquellos residuos en la interfase entre VL y VH como se define por ejemplo en Novotny and Haber Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chotia et al., mas arriba. En general, los residuos de empaque inusuales deberán ser retenidos en el anticuerpo humanizado si estos difieren de aquellos en los cuadros humanos.

En general, uno o mas de los aminoácidos que cumplen con los criterios antes mencionados se substituyen. En al-

gunas realizaciones, todos o la mayoría de aminoácidos que cumplen los criterios arriba mencionados son substituidos. Ocasionalmente, existe cierta ambigüidad con respecto a si un aminoácido en particular cumple con los criterios anteriores y se producen inmunoglobulinas variantes, una de las cuales tiene esa substitución en particular, la otra que no la tiene. Las inmunoglobulinas variantes alternativas producidas de esta manera pueden ser probadas en cualquiera de los ensayos descritos aquí para la actividad deseada, y se seleccionará la inmunoglobulina preferida.

Usualmente, las regiones CDRs en los anticuerpos humanizados son substancialmente idénticas y más usualmente idénticas a las regiones CDRs correspondientes en el anticuerpo del donante. Aunque no es lo mas deseable a veces es posible hacer una o dos substituciones conservativas de aminoácidos de los residuos CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Como substituciones conservativas entendemos las combinaciones como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.

Candidatos adicionales para la substitución son aminoácidos del cuadro del receptor humano que son inusuales o raros para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser substituidos con aminoácidos de las posiciones equivalentes del anticuerpo del donante ratón o de posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas mas típicas. Por ejemplo, las substitución podría ser deseable cuando el aminoácido en la región del cuadro humano de la inmunoglobulina del receptor es rara para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina del donante es común para esa posición en las secuencias de inmunoglobulina humanas o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina del receptor es rara para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina del donante también es rara con relación a otras secuencias humanas. Estos criterios ayudan a asegurarse de que un aminoácido atípico en el cuadro humano no interrumpa la estructura del anticuerpo. Mas aún, por medio del reemplazo de un aminoácido inusual con un aminoácido del anticuerpo del donante que parece ser típico para los anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado podría hacerse menos inmunogénico.

El término "raro", como se usa aquí, indica un aminoácido que ocurre en esa posición en menos del 20% pero en mas del 10% las secuencias de la región V de la cadena humana pesada o ligera en un banco de datos representativo, y el término "común" como se usa aquí indica un aminoácido que ocurre en mas de alrededor de 25% pero normalmente mas del 50% de las secuencias en una base de datos representa-

tiva. Todas las secuencias de región variable de cadena humana ligera y pesada son agrupadas respectivamente en subgrupos de secuencias que son especialmente homologas entre si y que tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones criticas (Rabat et al., mas arriba). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia de receptor humano es raro o común entre las secuencias humanas, será preferible a menudo considerar solo aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo de la secuencia del receptor.

Candidatos adicionales para la substitución son aminoácidos del cuadro del receptor humano que serían identificados como parte de una región de CDR bajo la definición alternativa que propone Chotia et al., mas arriba. Candidatos adicionales para la substitución son los aminoácidos del cuadro humano del receptor que serían identificados como parte de una región CDR bajo las definiciones de AbM y/o contacto. De manera notable, CDR1 en la cadena variable pesada se define como que incluye los residuos 26-32.

Excepto por las substituciones de aminoácidos específicos que se discuten líneas arriba, las regiones de cuadro de las inmunoglobulinas humanizadas son por lo general substancialmente idénticas, y mas por lo general, idénticas a las regiones de cuadro de los anticuerpos humanos de los cuales ellos fueron derivados. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región del cuadro contribuyen muy poco o no contribuyen directamente a la especificidad o afínidad de un anticuerpo. Por lo tanto muchas substituciones conservativas individuales de residuos de cuadro podrían ser toleradas sin un cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina resultante. Por lo tanto, en una realización la región de cuadro variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos el 85% de la identidad de secuencia de una secuencia de región de cuadro variable humana o de consenso de tales secuencias. En otra realización, la región de cuadro variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos el 90%, de preferencia 95%, de mayor preferencia 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de región de cuadro variable humana o el consenso de tales secuencias. En general, sin embargo tales substituciones no son deseables.

Los anticuerpos humanizados de preferencia exhiben una afinidad de unión específica al antígeno de al menos 10^7, 10^8, 10^9 o 10^{10} M^{-1}. Por lo general el límite superior de afinidad de unión de los anticuerpos humanizados al antígeno esta dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquel de la inmunoglobulina del donante. A menudo el limite inferior de la afinidad de unión también se encuentra dentro de un factor de tres, cuatro o cinco con relación al

de la inmunoglobulina del donante. Alternativamente, la afinidad de unión podría ser comparada a la de un anticuerpo humanizado que no tenga substituciones (por ejemplo un anticuerpo que tenga los CDRs del donante y los FRs del receptor, pero ninguna substitución de FR). En tales casos, la unión del anticuerpo optimizado (con substituciones). Es preferible al menos de dos a tres veces mayor o de tres a cuatro veces mayor que el de un anticuerpo no substituido para hacer comparaciones, la actividad de diversos anticuerpos puede ser determinada, por ejemplo mediante el BIACORE (es decir resonancia de la superficie del plasma usando reagentes no titulados) o ensayos de unión competitiva.

C. Producción de Anticuerpos Humanizados 3D6

Una realización preferida de la presente invención presenta un anticuerpo humanizado en el terminal N de Aβ, en particular, para el uso en la metodologías terapéuticas y/o de diagnósticos que se describen aquí. Un material particularmente preferido para iniciar la producción de anticuerpos humanizados es el 3D6. El 3D6 es un específico para el terminal N de Aβ y se ha demostrado que media fagocitosis de la placa amiloidea (ver ejemplos I-V). La clonación y secuenciación de cADN codificando las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo 3D6 se describe en el ejemplo VI.

La secuencia de anticuerpos del receptor humano adecuadas se identifican por medio de comparaciones de computadora de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se lleva acabo separadamente para las cadenas pesadas y ligeras pero los principios son similares para cada uno. En particular, los dominios variables para los anticuerpos humano de cuyas secuencias de cuadro exhiben un alto grado de identidad de secuencia con las regiones de cuadro VL y VH de la murina fueron identificados por una consulta a la base de datos Rabat usando el NCBI BLAST (accesible públicamente a través del servidor de internet los Nacional Institutes of Health NCBI) con las secuencias de cuadro respectivas de la murina.

Esta comparación revela que la cadena ligera 3D6 muestra la mayor identidad se secuencias a las cadenas humanas ligeras del subtipo Kappa II y que la cadena pesad 3D6 muestra la mayor identidad de secuencia a las cadenas pesadas humanas de subtipo III, como lo defina Babat et al., mas arriba. Así las regiones de cuadro humano ligera y pesadas son de preferencia derivadas de anticuerpo humanos de estos subtipos, o de secuencias de consenso de dicho subti-

po. Las regiones variables de cadena humana ligera que se prefieren y muestra la mayor identidad de secuencia con la región correspondiente de la 3D6 son de anticuerpos que tienen los números de identificación Kabat 019230, 005131, 005058, 005057, 005059, U21040 y U41645, siendo el 019230 el mas preferido, y son de regiones variables de línea de germinación A1, A17, A18, A2 y A19, siendo A19 la mas preferida. Las regiones variables de cadena humana pesada que se prefieren muestran la mayor identidad de secuencia a la región correspondiente de los 3D6 son de anticuerpos que tienen los números de identificación Rabat 045919, 000459, 000553, 000386 y M23691 siendo el 045919 el mas preferido, y son de las regiones variables de línea de germinación VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 y VH3-11, siendo el VH3-23 el mas preferido.

A continuación se seleccionan los residuos para la substitución como sigue. Cuando un aminoácido difiere entre una región de cuadro variante 3D6 y una región de cuadro variable equivalente humana, el aminoácido del cuadro humano normalmente será substituido por el equivalente del aminoácido de ratón si se puede esperar razonablemente que el aminoácido:

(1)se una de manera no covalente al antígeno directamente,

(2)sea adyacente a una región CDR, sea parte de la región CDR bajo la definición alternativa que propone Chotia et al., mas arriba, o que de otra manera interactúe con una región CDR (es decir dentro de alrededor de 3A de una región CDR) (Por ejemplo los aminoácidos en las posiciones L2, H49 y H94 del 3D6), o

(3)Participe en la interfase VL-VH (por ejemplo los aminoácidos en las posiciones L36, L46 y H93 del 3D6).

El moldeado por computadora de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 3D6, y la humanización del anticuerpo 3D6 se describen en el ejemplo VII. Brevemente, un modelo tridimensional fue generado basado en las estructuras de anticuerpos de murina mas cercanamente resueltos para las cadenas pesada y ligera. Par este propósito un anticuerpo designado 1CR9 (Base de Datos de Proteínas (PDB) ID:1CR9, Kanyo et al., J. Mol. Biol. 293:855 (1999)) fue escogido como un modelo para modelar la cadena ligera 3D6 y el anticuerpo se designó 1OPG (PDB ID:1OPG, Kodandapani et al., J. Biol. Chem. 270:2268 (1995)) que fue escogida como el modelo para moldear la cadena pesada. El modelo fue además refinado mediante una serie de paso de minimización de enrgía para liberar los contactos atómicos desfavorables y optimizar las interacciones electrostáticas Van der Walls. La estructura resuelta de

1qkz (PDB ID:1QKZ, Derrick et al., J. Mol. Biol. 293:81 (1999)) fue escogida como el modelo para moldear la CDR3 de la cadena pesada ya que 3D6 y 1OPG no exhibían una homología de secuencia significativa en esta región cuando se alineaban para propósitos de comparación.

La información estructural tridimensional de los anticuerpos que se describen aquí está disponible al público, por ejemplo a partir del Research Collaboraty for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB). El PDB es de acceso libre a través de la internet y lo describe Berman et al. (2000) Nucleic Acids Research, 28:235. El modelo por computadora permite la identificación de residuos que interactúan con la CDR. El modelo por computadora de la estructura del 3D6 puede a su vez servir como punto de partida para la predicción de la estructura tridimensional de un anticuerpo que contenga las regiones de determinación de complementariedad del 3D6 substituidas en las estructuras de cuadro humano. Los modelos adicionales se pueden construir para representar la estructura a medida que se introducen nuevas substituciones de aminoácidos.

En general, la substitución de uno, o la mayoría o de todos los aminoácidos que cumplen con los criterios arriba mencionados es deseable. En consecuencia, los anticuerpos humanizados de la presente invención contendrán usualmente la substitución de un residuo de cuadro de cadena ligera humana con un residuo de 3D6 correspondiente en al menos 1, 2 o 3, y mas generalmente 4 de las siguientes posiciones L1, L2, L36 y L46. Los anticuerpos humanizados también usualmente contienen una substitución de un residuo de cuadro de cadena pesada human con un residuo de 3D6 correspondiente en al menos 1, 2 y a veces 3, de las siguientes posiciones: H49, H93 y H94. Ocasionalmente, sin embargo existe cierta ambigüedad sobre si un aminoácido en particular cumple con los criterios anteriormente mencionados y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa substitución en particular y la otra no la tiene. En los casos donde la substitución con un residuo de murina introduciría un residuo que es raro en las inmunoglobulinas humanas en una posición en particular podría ser deseable examinar el anticuerpo para ver su actividad con y sin la substitución en particular. Si la actividad (por ejemplo la afinidad de unión y/o la especificidad de unión) es aproximadamente la misma con y sin la substitución, el anticuerpo sin substitución podría ser preferido ya que se esperaría que provoque menos respuesta HAHA, como se describe aquí.

Otros candidatos para la substitución son los aminoácidos del cuadro humano del receptor que son inusuales para

la inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser substituidos con aminoácidos de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas mas típicas. Alternativamente, aminoácidos de posiciones equivalentes en el 3D6 del ratón pueden ser introducidos en las regiones de cuadro humano donde dichos aminoácidos son típicos de la inmunoglobulina humana en posiciones equivalentes.

En realizaciones adicionales cuando el cuadro de cadena ligera humana de la inmunoglobulina del receptor es el número de identificación Kabat 019230, la cadena ligera sostiene substituciones en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o mas generalmente 13, de las siguientes posiciones L7, L10, L12, L15, L17, L39, L45, L63, L78, L83, L85, L100 o L104. En realizaciones adicionales cuando el cuadro de la cadena pesada humana de la inmunoglobulina del receptor es el número de identificación Kabat 045919, la cadena pesada contiene substituciones en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o mas generalmente 15 de las siguientes posiciones H3, H5, H13, H16, H19, H40, H41, H42, H44, H72, H77, H82A, H83, H84, o H108. Estas posiciones son substituidas con el aminoácido de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana que tiene un residuo de aminoácido mas típico. Ejemplos de los aminoácidos apropiados para substituir se muestran en las figuras 1 y 2.

Otros candidatos para la substitución son residuos no línea de germinación que ocurren en una región de cuadro (por ejemplo los residuos H74, H77 y/o H89 cuando se compara KABAT 045919 y VH3-23).

La Tabla 1 resume el análisis de secuencia de las regiones VH y VL del 3D6. Estructuras adicionales de ratón y humano que pueden ser usadas para la modelación por computadora del anticuerpo 3D6 y anticuerpos humanos adicionales se presenta también en secuencias de línea de germinación que pueden ser usadas en la selección de substituciones de aminoácido. Residuos raros de ratón también se presentan en la Tabla 1. Residuos raros de ratón son identificados por medio de la comparación de las secuencias VL y/o VH del donante con las secuencias de otros miembros del subgrupo al cual las secuencias VL y/o VH pertenecen (de acuerdo a Rabat) y identificando a las posiciones de residuo en las cuales difieren del consenso. Estas diferencias específicas de donante podrían apuntar a ciertas mutaciones somáticas que aumentarían la actividad. Residuos inusuales o raros cerca al punto de unión podrían posiblemente contactar el antígeno, haciendo deseable mantener el residuo del ratón. Sin embargo si el residuo inusual de ratón no es importante para la unión, el uso del residuo correspondiente del re-

ceptor es preferible ya que el residuo del ratón podría crear neo-epítopes inmunogénicos en el anticuerpo humanizado. En la situación cuando un residuo inusual en la secuencia del donante es en realidad un residuo común en la secuencia correspondiente del receptor el residuo que se prefiere es claramente el residuo del receptor.

Tabla 1: Resumen de la secuencia de región V de 3D6

Chain	Pesada	Ligera
Subgrupo de ratón (Kabat seq ID#)	IIID (002688)	II (005840-005844, 005851-005853, 005857, 005863)
Homólogos de ratón (Kabat/Genbank)	002727/163.1'CL 002711/H35-C6'CL 002733/8-1-12-5-3-1(A2-1)'CL 002715/ASWA2'CL 020669/#14'CL	005840/1210.7 005843/42.4b.12.2'CL 005842/BXW-14'CL 005841/42.7B3.2'CL 005851/36-60CRI-
Amino ácidos raros (% frequencia de ocurrencia en clase)	N40 (0.233%) D42 (0.699%)	Y1(.035%) I15 (3.3%) D27 (0.867%)-CDR1 I78 (0.677%) L85 (0.625%) W89 (0.815%)-CDR3 K106A (0.295%)
Subgrupo Humano	III (000488-000491, 000503, 000624)	II (005046)
Chothia canonica Agrupaciones CDR [ejemplo pdb]	H1: clase 1 [2fbj] H2: clase 3 [1igc]	L1: clase 4 [1rmf] L2: clase1 [1lmk] L3: clase 1 [1tet]
Estructuras más cercanamente resueltas de ratón.	PDB ID: 1OPG Kodandapani *et al.*, *supra*; (72% 2Å)	PDB ID: 1CR9; Kanyo *et al.*, *supra*; (94%, 2Å) PDB ID: 1NLD; Davies *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallog.* 53:186 (1997); (98%, 2.8Å)
Estructuras más cercanamente resueltas de humano.	1VH (68%, nmr) 443560 (65%, IgG, λ myeloma, 1.8Å) KOL/2FB4H (60%, myeloma, 3Å)	1LVE (57%, LEN) 1B6DA (54%; B-J dimer, 2.8Å); 1VGEL (54%, autoAb)
Consulta de línea de germinación (Hu) resultados (top 4)	VH3-48 (4512283/BAA75032.1) VH3-23 (4512287/BAA75046.1) VH3-7 (4512300/BAA75056.1) VH3-21 (4512287/BAA75047.1) VH3-11 (4152300/BAA75053.1)	A1(x63402) A17 (x63403) A18 (X63396) A2 (m31952) A19 (x63397)

*cadena ligera y cadena pesada del mismo anticuerpo (O-81, Hirabayashi *et al.* NAR 20:2601).

En una realización particularmente preferida, un anticuerpo humanizado de la presente invención comprende CDRs del 3D6 (por ejemplo uno, dos o tres CDRs de VL y/o uno, dos o tres CDRs de VH) y opcionalmente, tienen al menos uno (de preferencia dos, tres, cuatro o todas) de las siguientes actividades: (1) se une al agregado Aβ1-42 (por ejemplo

como lo determina ELISA); (2)se une al Aβ en placas (por ejemplo la coloración de placas AD y/o PDAPP); (3)se une a Aβ con una afinidad de unión dos a tres veces mayor en comparación con el 3D6 quimérico (por ejemplo el 3D6 que tiene CDRs de murina y FRs del receptor humano); (4)fagocitosis Aβ (por ejemplo en un ensayo de fagocitosis ex vivo como se describe aquí); y (5)cruza la barrera sangre-cerebro (por ejemplo demuestra una localización en el cerebro a corto plazo, por ejemplo en el modelo animal PDAPP como se describe aquí).

3. Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos humanos contra el Aβ son provistos mediante una variedad de técnicas que se describen líneas abajo. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan por experimentos de unión competitiva, o de otra manera por tener la misma especificidad de epítope que un anticuerpo de ratón en particular, tal como uno de los monoclonos de ratón que se describen aquí. Los anticuerpos humanos también pueden ser filtrados para la especificidad de un epítope en particular usando solamente un fragmento del Aβ como el inmunogeno, y/o por el filtrado de anticuerpos contra una colección de mutantes de eliminación de Aβ. Los anticuerpos humanos que de preferencia tienen la especificidad para el isotipo IgG1.

a. Metodología de Trioma

La estrategia básica y un ejemplo de fusión de celdas asociadas, SPAZ-4 para el uso en esta estrategia se han descrito en Oestberg et al., Hybridoma 2:361 (1983); Oestberg, US Patent No. 4,634,664; y Engleman et al., Patente US 4,634,666 (cada una de las cuales es incorporado aquí como referencia en su totalidad para todo propósito). Las líneas de células que producen anticuerpos obtenidas por este método se llaman triomas, debido a que descienden de tres células; dos humanas y una de ratón. Inicialmente, la línea del mieloma de ratón es fundida con un linfocito humano B para obtener una célula híbrida xenogénica que no produce anticuerpos, tal como la línea de celdas SPAZ-4 descrita por Oestberg mas arriba. La célula xenogénica es entonces usada con un linfocito humano B para obtener una línea de celdas trioma productora de anticuerpos. Se ha descubierto que los triomas producen anticuerpos de manera mas estable que las hibridomas ordinarias que hacen las células humanas.

Los linfocitos B inmunizados son obtenidos a partir de la sangre, el bazo, los nodos linfáticas o la médula ósea de un donante humano. Si los anticuerpos contra un antígeno

específico o epítope son deseados es preferible usar ese antígeno o epítope para la inmunización. La inmunización puede hacerse in vivo o in vitro. Para la inmunización in vivo, típicamente se aísla celdas B de un humano inmunizado con Aβ, un fragmento del mismo un polipéptido mas grande conteniendo el Aβ o el fragmento, o un anticuerpo anti-ideotípico para un anticuerpo del Aβ. En algunos métodos, las células B son aisladas del mismo paciente que finalmente recibirá la administración de la terapia anticuerpos. Para la inmunización in vitro, los linfocitos B son típicamente expuestos al antígeno por un periodo de 7-14 días en un medio tal como el RPMI-1640 (ver Engleman, mas arriba) suplementado con 10% de plasma humano.

Los linfocitos humanizados B son unidos a una célula híbrida xenogénica tal como SPAZ-4 por métodos bastante conocidos. Por ejemplo, las células son tratadas con 40-50% de glicol polietileno de MW 1000-4000, a alrededor de 37°C, por 5-10 minutos. Las celdas se separan de la mezcla por fusión y se propagan en un medio selectivo para los híbridos que se desean (HAT o AH). Los clones que hacen la secreción de anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida se identifican por medio de un ensayo a un cultivo de trioma para la habilidad de unirse al Aβ o a un fragmento del mismo. Los triomas que producen anticuerpos humanos y que tienen la especificidad deseada son subclonados mediante la técnica de dilución limitada y son cultivados in vitro dentro de un medio apropiado. Las células trioma obtenidas son entonces examinadas para ver su habilidad de unirse al Aβ o a un fragmento del mismo.

Aunque los triomas son genéticamente estables ellos no producen anticuerpos a niveles muy altos. Los niveles de expresión pueden ser aumentados clonando genes de anticuerpos a partir del trioma en uno o mas vectores de expresión y transformando el vector en un mamífero estándar bacterial o células lineares de levadura.

b. Mamíferos no Humanos Transgénicos

Los anticuerpos humanos contra el Aβ también pueden ser producidos a partir de mamíferos transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana. Generalmente, el locus de la inmunoglobulina endógena de tales mamíferos transgénicos es funcionalmente inactivada. De preferencia el segmento del locus de la inmunoglobulina humana incluye secuencias no reordenadas de los componentes de las cadenas pesada y ligera. Ambas inactivaciones de los genes de inmunoglobulina endógena y la introducción de genes de inmunoglobulina exógena pueden ser logradas mediante recombina-

ción homologa dirigida o mediante la introducción de cromosomas YAC. Los mamíferos transgénicos que resultan de este proceso son capaces de funcionalmente reorganizar las secuencias de componente de la inmunoglobulina, y expresar un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por los genes de inmunoglobulina humana, sin expresar genes de inmunoglobulina endógenos. La producción y propiedades de mamíferos que tienen estas propiedades se describen en detalle en por ejemplo Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148:1547 (1994), Nature Biotechnology 14:826 (1996), Kucherlapati, Wo 91/10741 (1991) (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Los ratones transgénicos son particularmente adecuados. Los anticuerpos anti- Aβ son obtenidos mediante la inmunización de un mamífero transgénico no humano, tal como lo describe Longer o Kucherlapati, mas arriba, con Aβ o un fragmento del mismo. Se preparan anticuerpos monoclonales por ejemplo fundiéndo células B de dichos mamíferos a líneas de celdas de mieloma adecuadas de dichos mamíferos usando la tecnología convencional Kohler-Milstein. Los anticuerpos policlonales humanos también pueden ser provistos en forma de suero para humanos inmunizados con un agente inmunogénico. Opcionalmente, dichos anticuerpos policlonales pueden ser concentrados por purificación de afinidad usando Aβ u otro péptido amiloide como un reagente de afinidad.

c. Métodos de Mostrar Fajia

Otra técnica para obtener anticuerpos humanos anti- Aβ es filtrar una librería ADN de celdas humanas B de acuerdo al protocolo general delineado por Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989). Como se describe para la metodología del trioma, dichas células B pueden ser obtenidas a partir de un humano inmunizado con Aβ, fragmentos, péptidos mas largos que contienen Aβ o fragmentos o anticuerpos anti-ideopáticos. Opcionalmente, dichas células B se obtienen a partir de un paciente que será quien reciba el tratamiento de anticuerpos. Los anticuerpos que se unen a Aβ o un fragmento del mismo son seleccionados. Las secuencias que codifican dichos anticuerpos (o fragmentos de unión) son entonces clonados y amplificados. El protocolo descrito por Hse resulta mas eficiente en combinación con la tecnología de mostrar fajia. Ver por ejemplo Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, Herzig et al., US 5,877,218, Winter et al., US 5,871,907, Winter et al., US 5,858,657, Holliger et al., US 5,837,242, Jonson et al., US

5,733,743 y Hoogenboom et al., US 5,565,332 (cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos sus propósitos). En estos métodos, las librerías de fajia son producidas en donde los miembros muestran diferentes anticuerpos sobre sus superficies exteriores. Los anticuerpos normalmente se muestran como fragmento FV o Fab. Los anticuerpos que muestran fajias con una especificidad deseada son seleccionados por enriquecimiento de afinidad a un péptido Aβ o un fragmento del mismo.

En una variación del método de mostrar fajias, anticuerpos humanos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo de murina seleccionado podrían ser producidos. Ver Winter, WO 92/20791. En este método, se usa la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo seleccionado de murina como material de inicio. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena ligera como material de inicio, se construye una librería de fajia en la cual los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir el material inicial de murina) y una región variable de cadena pesada distinta. Las regiones variables de cadena pesada son obtenidas de una librería de regiones variables humanas de cadena pesada reordenadas. Una fajia que muestra una fuerte unión específica para el Aβ (al menos 10^8 y de preferencia al menos 10^9 M^{-1}) es seleccionada. La región variable de cadena pesada humana de esta fajia entonces sirve como material de inicio para la construcción de una librería de fajia adicional. En esta librería cada fajia muestra la misma región variable de cadena pesada (es decir la región identificada a partir de la primera librería que se muestra) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se obtienen a partir de una librería de regiones de cadena ligera humana variable reordenada. Nuevamente, las fajias que muestran fuerte unión específica para Aβ son seleccionadas. Estas fajias muestran regiones variables de anticuerpos anti-Aβ completamente humano. Estos anticuerpos generalmente tienen la misma o similar especificidad de epítope como el material de murina de inicio.

4. Producción de Regiones Variables

Habiendo seleccionado conceptualmente la CDR y el cuadro de las inmunoglobulinas humanizadas, existe una variedad de métodos para producir dichas inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencia de ácido nucleico encodificarán cada secuencia de aminoácido de inmunoglobulina. Las secuencias ácido nucleicas que se deseen pueden ser producidas por medio de novo síntesis de fase sólida de ADN o mediante la VCR mutagenesis de una

variante preparada con anterioridad del polinucleoiquido deseado. La mutagenesis mediada por poligonucleótido es un método preferido par preparar variantes de substitución, eliminación e inserción del polipéptido ADN objetivo. Ver Adelman et al., ADN 2:183 (1983). Brevemente, el polipéptido ADN objetivo es alterado mediante la hibridización de un poligonucleótido que codifica la mutación deseada a un modelo de ADN de una sola banda. Luego de la hibridización, una polimerasa ADN se usa para sintetizar una segunda banda complementaria completa del modelo que incorpora el poligonucleótido de muestra y codifica la alteración seleccionada en el polipéptido ADN objetivo.

5. Selección de Regiones Constantes

Los segmentos variables de anticuerpos producidos como se describe arriba (por ejemplo las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos humanizados o humanos) están típicamente ligados a al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Las secuencías ADN de región constante humanas pueden ser aisladas de acuerdo con procedimientos conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente de células B inmortalizadas (ver Rabat et al., mas arriba, y LIU et al., W087/02671) (cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad para todos los propósitos). Ordinariamente, el anticuerpo contendrá tanto regiones constantes de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada generalmente incluye CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 como regiones. Los anticuerpos descritos aquí incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Escoger la región constante depende en parte de si se desea un anticuerpo dependiente complementario o uno celular de toxicidad mediada. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad complementaria y los isotipos IgG2 e IgG4 no la tienen. Cuando se desea que el anticuerpo (por ejemplo anticuerpo humanizado) exhiba actividad citotóxica, el dominio constante es generalmente un dominio constante de fijación de complemento y la clase es típicamente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante podría ser de la clase IgG2. La elección del isotipo también puede afectar el paso de anticuerpos hacia el cerebro. Se prefiere el isotipo humano IgG1. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. El anticuerpo humanizado podría comprender secuencias de mas de una clase o isotipo. Los anticuerpo pueden ser ex-

presados como tetrameros conteniendo dos cadenas ligeras y dos pesadas como cadenas pesadas separadas y cadenas ligeras como Fab, Fab' F(ab')2, y Fv, o como cadenas simples de anticuerpos en las cuales los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras se encuentran enlazados a través de un espaciador.

6. Expresión de Anticuerpo Recombinantes

Los anticuerpos quiméricos humanizados y humanos son típicamente producidos mediante expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada, opcionalmente enlazados a regiones constantes, son insertados dentro de vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada pueden ser clonadas en los mismos o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina son operablemente enlazados a frecuencias de control en los vectores de expresión que aseguran la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de expresión incluyen, pero no se limitan a, promotores (es decir promotores naturalmente asociados o heterologos), secuencias de señal, elementos de mejora, y secuencias de terminación de transcripción. De preferencia las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o de afectar las células portadora eucarióticas. Una vez que el vector ha sido incorporado en el portadora apropiado, el portadora es contenido bajo condiciones adecuadas para el mas alto nivel de expresión de las secuencias de los nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos portadora ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del portadora. Por lo general, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo la resistencia a la ampicilina, la resistencia a la higromicina, la resistencia a la tetraciclina o la resistencia a la neomicina) para permitir la detección de aquellas células que se han transformado con las secuencias de ADN deseadas (ver por ejemplo Itakura et al., US Patent 4,704,362).

E. coli es un portadora procariótico particularmente útil para la clonación polinucleótida (por ejemplo secuencias ADN) de la presente invención. Otros portadoras microbianos adecuados para este uso incluyen bacilos tales como el Bacilus subtilus, y otras enterobacterias tales comola Salmonera, Serratia y varias especies Pseudonomanas. In estos portadoras procarióticos, uno también puede hacer vectores de expresión, los cuales típicamente contendrán se-

cuencias de control de expresión compatibles con la célula portadora (por ejemplo un origen de replicación). Además hay una gran cantidad de promotores conocidos que estarán presentes tales como el sistema promotor de lactosa, el sistema promotor triptopan, el sistema promotor beta-lactamasa o el sistema promotor de la fase lambda. Los promotores típicamente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tendrán secuencias de punto de unión de ribosoma y sus similares para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios como la levadura también son útiles para la expresión. El Sacaromices es una levadura portadora preferida, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (por ejemplo promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como se desee. Los promotores típicos incluyen la quinaza 3-fosfoglicerato y otras enzimas glicolíticas. Los promotores inducibles de levadura, incluyen entre otros, promotores de alcohol de hidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa.

Además de los microorganismos, cultivo de celdas de tejidos de mamíferos podrían también ser usadas para expresar y producir polipéptidos de la presente invención (por ejemplo polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas). Ver, Winnacker, from Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucarióticas son en realidad preferidas debido a una cantidad de líneas de celdas portadora adecuadas que son capaces de secretar proteínas heterólogas (inmunoglobulinas intactas) que han sido desarrolladas en esta ciencia, e incluyen líneas de celdas CHO, diversas líneas de celdas Cos, células HeLa, de preferencia líneas de células mieloma, o células B transformadas o hibridomas. De preferencia las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un mejorador (Queen et al., Immunol. Rev 89:49 (1986)), y sitios de procesamiento de información necesarios tales como los puntos de unión de los ribosomas, los puntos de división de la RNA, los puntos de la poliadenilación, y la secuencias terminadoras de trascripción. Las secuencias de control de expresión que se prefiere son los promotores que derivan de los genes de la inmunoglobulina, SV 40, adenovirus, el virus papiloma bovino, citomegalovirus y sus similares. Ver Cd et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Alternativamente la secuencias codificadoras de anticuerpos pueden ser incorporadas en los transgenes mediante la introducción dentro del genoma de un transgene animal y

la expresión subsecuente en la leche del animal transgénico (Ver, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, y Meade et al., US 5,849,992). Los transgenes adecuados incluyen las secuencias de codificación para cadenas ligeras y o pesadas en enlace operativo con un promotor y un mejorador a partir de un gene específico de una glándula mamaria, tal como la caseína o la lactoglobulina beta.

Los vectores que contienen la secuencias polinucleóticas de interés (por ejemplo las secuencias de codificación de cadena pesada y ligera y la secuencia de expresión y control), pueden ser transferidas hacia la célula portadora por métodos conocidos los cuales variaran dependiendo del tipo de portadora celular. Por ejemplo la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procarióticas mientras que un tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolixisti, o transfeción basada en virus podria ser usada para otros portadoras celulares . (Ver en general Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989) (se incorpora aquí como referencia en su totalídad para todos los propósitos).

Otros métodos usados para transformar células mamíferas incluyeh el uso de polibrin, fusión protoplástica, liposomas, electropolación, y micro inyección (ver generalmente Sambrook et al., mas arriba). Para la producción de animales transgénicos los transgenes pueden ser micro inyectados en embriones fertilizados o pueden ser incorporados en el genoma de las células de raíz embriónicas, y los núcleos de dichas celdas transferidos hacia embriones sin núcleo.

Cuando se clona cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, los vectores son co-transfectados para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunogloblinas intactas. Una vez expresados los anticuerpos completos, sus retardadores las cadenas individuales ligeras y pesadas, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden ser purificadas de acuerdo a procedimientos estándar en esta ciencia, incluyendo la precipitación en sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografías de columna la purificación HPLC, la electoforesis en gel y sus similares (Ver generalmente Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos 90 a 95% de homogeneidad se prefieren y de 98 a 99 % o mas de homogeneidad o mas preferidos de usos farmacéuticos.

7. Fragmentos De Anticuerpos

También se contempla dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos. En una realización los

fragmentos de anticuerpos no humanos, quiméricos y o humanos son provistos. En otra realización , fragmentos de anticuerpo humanizados son provistos.. Típicamente estos fragmentos se exhiben unión específica a antígenos con una afinidad de al menos 10^{-7} y más típicamente 10^{-8} o 10^{-9} M. Los fragmentos de anticuerpos humanizados incluyen cadenas separadas del tipo pesado y del tipo ligero Fab, Fab', F(ab')2, Fabc, y Fv. Los fragmentos son producidos mediante técnicas de ADN recombinante o mediante la separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

8. Examinación de la eficacia terapéutica de los anticuerpos en modelos animales

Grupos de ratones PDAPP de 7 a 9 meses de edad cada uno son inyectados con 0.5 mg de anticuerpos monoclonales específicos anti-Aβ o policlonales anti-Aβ en PBS. Todas las preparaciones de anticuerpos son purificadas para que tengan bajos niveles de endotoxininas. Los monoclonales pueden ser preparados contra un fragmento mediante la inyección del fragmento o mas larga de Aβ en un ratón , preparando hibridomas y filtrando los hibridomas para lograr un anticuerpo y específicamente se unan al fragmento deseado de Aβ sin unirse a otros fragmentos no translapantes de Aβ.

Los ratones son inyectados intraperitonealmente según se necesite durante un periodo de cuatro meses para mantener una concentración de anticuerpos circulante que se mide mediante una titulación ELISA o mayor de 1/ 1,000 ELISA con relación a Aβ 42 u otro inmunógeno. Las titulaciones son monitoreadas y los ratones son eutanizados al final de 6 meses de inyecciones. Se realiza una histocremistia, para los niveles Aβ y toxicología post-mortem . Diez ratones se usan por grupo.

9 Filtrando Los Anticuerpos Para La Actividad De Limpieza

La invención brinda métodos de pintar un anticuerpo para su actividad en la limpieza de un deposito amiloideo o cualquier otro antígeno o una entidad biológica asociada, para la cual se desee esta actividad de limpieza. Para filtrar la actividad contra un depósito amiloideo una muestra del tejido del cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer o un modelo animal que tenga las características de la patología de Alzheimer se pone en contacto con células fagocíticas que llevan un receptor Fc, tales como las células microgliales, y el anticuerpo bajo prueba en un medio in vitro. Las células fagocíticas pueden ser de un cul-

tivo primario o de una línea de células, tal como BV -2, C8- B4, o THP-1. en algunos métodos, los componentes son combinados sobre una placa de microscopio para facilitar el monitoreo por microscopio. En otros métodos múltiples reacciones se llevan acabo en paralelo en el recipiente de un plato microtitulador. En tal formato una plaqueta miniatura de microscopio pueden ser montada en pocitas separadas o un formato de detección no microscópica tal como la detección ELISA de Aβ para usar. De preferencia una serie de medidas se hace de la cantidad del deposito de amiloideo en la mezcla de reacción in vitro, empezando a partir de un valor de base antes de que la reacción haya procedido, y uno o mas valores de prueba durante la reacción. El antígeno se puede detectar por medio de la coloración por ejemplo con un anticuerpo titulado fluorescente al Aβ u otro componente de las placas amiloideas. El anticuerpo usado para coloración podría o no ser el mismo que el anticuerpo que se esta examinando en el sentido de actividad de limpieza. Una relación relativa y línea de base durante la presión de los depósitos amiloideos amiloideos indica que el anticuerpo bajo examen tiene actividad de limpieza. Tales anticuerpos es probables que sean útiles en la producción del tratamiento dé las enfermedades de Alzheimer u otras enfermedades amiloideogénicas.

Se puede usar métodos análogos para filtrar anticuerpos en su actividad de limpieza contra otros tipos de identidades biológicas el ensayo puede ser usado para detectar la actividad de limpieza contra prácticamente cualquier tipo de entidad biológica. Típicamente la entidad biológica tiene algún rol en las enfermedades humanas o animales. La entidad biológica puede ser provista como una muestra de tejido o en forma aislada. Si se da en forma de muestra de tejido, la muestra de tejido será preferiblemente no fijada para permitir un acceso rápido a los componentes de esta muestra de tejido y para evitar la perturbación de la conformación de los componentes incidentales a la fijación. Ejemplos de tejido de muestra que pueden ser probados en este ensayo incluyen tejidos canceroso, tejido precanceroso, tejido que contienen crecimientos benignos tales como verrugas o lunares, piel infectada con microorganismos patogénicos, piel infiltrada con células inflamatorias, piel que lleva matrices patológicas, entre sus células (por ejm pericarditis fibrinosa), piel que lleva antigenos aberrantes , y la piel de las cicatrices. Ejemplo de entidades biológicas aisladas que pueden ser usadas incluyen Aβ, antígenos virales o virases, proteoglicanos, antígenos de otros micro organismos patogénicos, antígenos tumorales,y moléculas de adhesión. Dichos antígenos pueden ser obteni-

dos a partir de fuentes naturales, expresiones recombinantes o síntesis química entre otros medios. El tejido muestra de una entidad biológica aislada es contactado con células fagocíticas que llevan recetores Fc tales como los monocitos, las células microviales, y un anticuerpo que será probado en un medio. El anticuerpo puede ser dirigido a la entidad biológica que se esta examinado o hacia un antígeno asociado con la identidad. En esta ultima situación el objeto es comprobar si es que la identidad biológica esta fagocitoceada vicariamente con el antígeno. Por lo general aunque no necesariamente, el anticuerpo y la identidad biológica (a veces con un antígeno asociado, entra en contacto una con la otra antes de añadir la células fagocíticas. La concentración de la entidad biológica y/o el antígeno asociado que permanece en el medio si está presente es entonces monitoreado. Una reducción en la cantidad de concentración de antígeno o de la entidad biológica asociada en el medio indica el anticuerpo tiene una respuesta de limpieza contra el antígeno y o la entidad biológica asociada en conjunto con la células fagocíticas (Ver, Ejemplo IV).

B. Codificación de Agentes Inmunológicos y Terapéuticos por Ácido Nucleico

Respuestas inmunes contra depósitos de amiloide también pueden ser inducidas mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y sus cádenas componentes usadas para la inmunización pasiva. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o RNA. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno esta típicamente unido a elementos regulatorios, tales como un promotor y un mejorador, que permiten la expresión del segmento ADN en las células objetivo que se intentan corregir en un paciente. Para la expresión en las células de la sangre, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, los elementos promotor y mejorador de las cadenas ligera o pesada de los genes de la inmunoglobulina o el CMV principal promotor temprano y mejorador son adecuados para la expresión directa. Los elementos regulatorios enlazados y las secuencias de codificación son a menudo clonadas dentro de un vector. Para la administración de anticuerpos de doble cadena, las dos cadenas pueden ser clonadas en los mismos o en vectores separados.

Un cierto número de sistemas de vector viral se encuentran a disposición incluyendo sistemas retrovirales (ver, por ejemplo Lawrie and Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)); vectores adenovirales (ver, por ejemplo Bett et al., J. Virol. 67:5911 (1993)); vectores de virus adenoasociados (ver, por ejemplo, Zhou et al., J.

Exp. Med. 179:1867 (1994)), vectores virales de la familia de las viruelas incluyendo el virus de la vacuna y los virus de la viruela avían, los vectores virales de los genus del virus alfa, tales como aquellos que se derivan de Sinbdis y Semliki Forest Virases (ver, por ejemplo, Dubensky et al., J. Virol. 70:508 (1996)), el virus de la encefalitis equina Venezolana (ver, Johnston et al., US 5,643,576) y los rhabdoviruses, tales como el virus de estomatitis vesicular (ver Rose, WO 96/34625) y los virases de papiloma (Ohe et al., Human Gene Therapy 6:325 (1995); Woo et al., WO 94/12629 y Xiao & Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 26302622 (1996)).

El ADN codificando un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, puede ser empaquetado el liposomas. Los lípidos adecuados y sus análogos relativos se describen en Eppstein et al., US 5,208,036, Felgner et al., US 5,264,618, Rose, US 5,279,833, y Epand et al., US 5,283,185. Los vectores y el ADN codificando un inmunógeno también pueden ser absorbidos o asociados con portadores particulares ejemplo de los cuales incluyen polímeros de metacrílato polimetil y polilactidos y poli (láctidos coglicolidos), ver, por ejemplo, MaGee et al., J. Micro Encap. (1996).

Los vectores de terapia de genes o polipéptidos desnudos (por ejemplo ADN) pueden ser administrados in vivo mediante la administración a un paciente individual, típicamente mediante la administración sistémica (por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o en aplicación tópica (ver, por ejemplo, Anderson et al., US 5,339,346). El término "polinucleótido desnudo" se refiere a un polinucleótido que no esta en un complejo con materiales coloidales. Los polinucleótidos desnudos son a veces clonados en un vector plasmado. Dichos vectores pueden además incluir agentes facilitadotes tales como el bupivacine (Attardo et al., US 5,593,970). El ADN también puede ser admistrado usando una pistola de genes . Ver, Xiao & Brandsma, mas arriba. El ADN codificando un inmunógeno es precipitado sobre la superficie de una cuentas metálicas microscópicas. Los micro proyectiles son acelerados mediante una onda de choque o con gas de helio en expansión, y penetran tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, The Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agacetus, Inc. MIddleton WI es adecuado. Alternativamente el ADN desnudo puede pasar a través de la piel dentro del flujo sanguíneo simplemente apuntando al ADN sobre la piel mediante la irritación química o mecánica (ver Howell et al., WO 95/05853).

En otra variación, los vectores codificando inmunógenos pueden ser administrado a células ex vivo, tales como las células que son retiradas de un paciente individual (por ejemplo linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejidos) o células de raíz hematopoiética del donante universal, seguidas por la reimplantación de estas células en un paciente, generalmente luego de seleccionar las células que tienen el vector incorporado.

II. Métodos Profilácticos y Terapéuticos

La presente invención es dirigida inter alia al tratamiento de Alzheimer y otras enfermedades amiloideogénicas mediante la administración de reagentes inmunológicos terapéuticos (por ejemplo, inmunoglobulinas humanizadas) hacia epítopes específicos dentro de Aβ a un paciente bajo condiciones que generan una respuesta beneficiosa (por ejemplo fagocitosis de Aβ, reducción de la carga de placa y/o reducción de una distrofia neurítica) en el paciente. El término "tratamiento" como se usa aquí, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea de células de un paciente que tiene una enfermedad, el síntoma de una enfermedad o la predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, liberar, altera, remediar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

En un aspecto, la invención brinda métodos de prevenir o tratar una enfermedad asociada con depósitos amiloideos de Aβ en el cerebro de un paciente. Dichas enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down y la dificultad cognitiva. Esta última puede ocurrir con o sin otras características de una enfermedad amiloidógena. Algunos métodos de la invención incluyen la administración de una dosificación efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a un componente de un depósito amiloideo en el paciente. Dichos métodos son particularmente útiles para la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en pacientes humanos. Los métodos de ejemplo involucran la administración de una dosificación efectiva de un anticuerpo que se une al Aβ. Los métodos preferidos involucran la administración de una dosificación efectiva de un anticuerpo que específicamente se una a un epítope dentro de los residuos 1-10 de Aβ, por ejemplo, anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 1-3 de Aβ, anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 1-4 de Aβ, anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 1-5 de Aβ, anticuerpos que específicamente se unen a un

Aβ, anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 1-6 de Aβ, anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 1-7 de Aβ o anticuerpos que específicamente se unen a un epítope dentro de los residuos 3-7 de Aβ. En otro aspecto, la invención presenta la administración de anticuerpos que se unen a un epítope que comprende un residuo de terminal N libre de Aβ. En otro aspecto mas, la invención presenta la administración de anticuerpos que se unen a un epítope dentro de residuos del 1-10 de Aβ donde el residuo 1 y/o el residuo 7 del Aβ es ácido aspártico. En otro aspecto mas, la invención presenta la administración de anticuerpos que específicamente se unen al péptido Aβ sin unirse a la proteína precursora amiloide de longitud total (APP). Y en otro aspecto mas el isotipo del anticuerpo es IgG1 humana.

En otro aspecto mas, la invención presenta la administración de anticuerpos que se unen a un depósito amiloideo en el paciente y que inducen a una respuesta de limpieza contra contra el depósito amiloideo. Por ejemplo, dicha respuesta de limpieza puede ser efectuada mediante la fagocitosís mediada por el receptor Fc.

Los agentes terapéuticos de la invención están substancialmente puros de contaminantes indeseados. Esto significa que un agente es típicamente por lo menos alrededor de 50% w/w (peso/peso) de pureza, así como que se encuentra substancialmente libre de proteínas que interfieran y de contaminantes. A veces los agentes son por lo menos de 80% w/w, y mas preferiblemente de al menos 90 o 95% w/w de pureza. No obstante, usando técnicas de purificación de proteína convencionales, se puede obtener péptidos homogéneos de al menos 99% w/w.

Los métodos pueden usarse tanto en pacientes asintomáticos como en aquellos que actualmente muestran los síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos usados en dichos métodos pueden ser humanos, humanizados, quiméricos o no humanos, o fragmentos de los mismos, (por ejemplo fragmentos de unión de antígenos) y pueden ser monoclonales o policlonales, como se describe aquí. En otro aspecto mas, la invención presenta la administración de anticuerpos preparados a partir de un humano inmunizado con un péptido Aβ, en el cual el humano puede ser el paciente que va ser tratado con el anticuerpo.

En otro aspecto, la invención presenta la administración de un anticuerpo con un portador farmacéutico en forma de composición farmacéutica. Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado a un paciente mediante la administración de un polinucleótido codificando al menos una cadena de anticuerpo. El polinucleótido se expresa para se

expresa para producir la cadena del anticuerpo en el paciente. Opcionalmente, el pòlinucleótido codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. El polinucleótido es expresado para producir cadenas pesadas y ligeras en el paciente. En realizaciones de ejemplo el paciente es monitoreado para ver el nivel de anticuerpo administrado en la sangre del paciente.

La invención por lo tanto satisface una esperada necesidad de regímenes terapéuticos para prevenir o mejorar la neuropatología, y en algunos pacientes, la dificultad de conocimiento que se asocia a la enfermedad de Alzheimer.

A. Pacientes que son Sujetos de Tratamiento

Los sujetos que son sujetos de tratamiento incluyen individuos que están en riesgo de la enfermedad pero que no muestran los síntomas, así como los pacientes que actualmente muestran síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera se encuentra en riesgo de sufrir la enfermedad si el o ella vive lo suficiente. En consecuencia, los presentes métodos pueden ser administrados profilácticamente a la población en general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo hacia el paciente. Los presentes métodos son especialmente útiles en individuos que tienen un riesgo genético conocido de la enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina mediante el análisis de marcadores bioquímicos o genéticos. Los marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen las mutaciones en el gen APP, en particular las mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 las que se denominan mutaciones Hardy y Swedish respectivamente (ver Hardy, mas arriba). Otros marcadores de riesgo son las mutaciones en los genes presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, una historia familiar de la enfermedad de Alzheimer, la hipercolesterolemia o ateroesclerosis. Los individuos que actualmente sufren la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidos por la demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo que se describen anteriormente. Además un número de exámenes de diagnóstico se encuentran disponibles para identificar individuos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen la medición de los niveles de CSF tau y Aβ42. Una medida elevada de tau y una medida disminuida de los niveles de Aβ42 significa la presencia de Alzheimer. Los individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer también pueden ser diagnosticados mediante los criterios ADRDA como se discute en la sección de ejemplos.

En los pacientes asintomáticos, el tratamiento puede empezar a cualquier edad (por ejemplo 10, 20, 30). Usualmente, sin embargo, no es necesario empezar el tratamiento hasta que el paciente llega a los 40, 50, 60 o 70. El tratamiento típicamente involucra múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede ser monitoreado mediante ensayos de los niveles de anticuerpo en relación al tiempo. Si la respuesta decae, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de pacientes propensos al síndrome de Down, el tratamiento puede empezar antenatalmente mediante la administración terapéutica del agente a la madre o inmediatamente después del nacimiento.

B. Regímenes y Dosificación del Tratamiento

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o medicamentos son administrados hacia un paciente que es susceptible de, o en riesgo de, la enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la severidad, o retrazar el inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas se administran composiciones o medicamentos a un paciente que se sospecha o que ya sufre de dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos parcialmente detener, los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad.

En algunos métodos, la administración del agente reduce o elimina la dificultad miocognitiva en pacientes que aún no han desarrollado las patologías características de Alzheimer. Una cantidad adecuada para lograr el tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis efectiva terapéuticamente o profilácticamente. En ambos regímenes profiláctico y terapéutico, los agentes son generalmente administrados en varias dosificaciones hasta que se haya logrado una respuesta inmune suficiente. El término "respuesta inmune" o "respuesta inmunológica" incluye el desarrollo de una respuesta humoral (por medio de anticuerpos) y/o celular (mediada por células T antígeno-específicas o los productos de su secreción) dirigida contra un antígeno en un sujeto que la recibe. Dicha respuesta puede ser una respuesta activa, es decir, inducida mediante la administración del inmunógeno o una respuesta pasiva, es decir, inducida mediante la administración de inmunoglobulina o anticuerpo de células T tratadas.

Un agente inmunogénico o inmunógeno es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí mismo en la administración a un mamífero, opcionalmente en conjunción con un adyuvante. Típicamente la respuesta inmune es monitoreada y se administran dosificaciones repetidas si la respuesta inmune empieza a decrecer.

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de las condiciones anteriormente descritas varían dependiendo de muchos factores distintos, incluyendo los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, de otras medicaciones que se administran, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Generalmente el paciente es un humano pero también se puede tratar a mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento necesitan ser tituladas para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para la inmunización pasiva con un anticuerpo, las dosificaciones varían desde alrededor de 0.0001 a 100 mg/kg, y mas usualmente 0.01 a 5 mg/kg, del peso corporal del portadora. Por ejemplo las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg, de preferencia al menos 1 mg/kg. Los sujetos pueden recibir administración de dosis diarias, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo a cualquier otro programa que se determine mediante un análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo involucra la administración en múltiple dosificaciones sobre un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos 6 meses. Los regímenes adicionales de tratamiento de ejemplo involucran la administración una vez cada 2 semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos 30mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión son administrados simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo cae dentro de los rangos indicados.

El anticuerpo es generalmente administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica mediante la mediad de los niveles en las sangre del anticuerpo al Aβ en el paciente. En algunos métodos, la dosificación es ajustada para lograr una dosificación de anticuerpo en el plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Alternativamente el anticuerpo puede ser administrado como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se re-

quiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo del tiempo medio de vida del anticuerpo en el paciente. En general los anticuerpos humanos muestran la mas larga vida media, seguida por los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos.

La dosificación y frecuencia de la administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los anticuerpos presentes o un cóctel de los mismos son administradas al paciente que aún no está en el estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como la dosis efectiva profiláctica. En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependerán del estado de salud del paciente y su inmunidad general, pero generalmente variarán de 0.1 a 25 mg por dosis, especialmente 0.5 a 2.5 mg por dosis. Una dosificación relativamente baja es administrada a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus días.

En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta (por ejemplo, de 1 a 200 mg de anticuerpos por dosis con dosificaciones de 5 a 25 mg siendo mas comúnmente usadas) a intervalos relativamente cortos es a veces requerida hasta que la progresión de la enfermedad sea reducida o terminada, y de preferencia hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. De ahí en adelante al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos varían de entre 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, o 30-300 µg de ADN por paciente. Las dosis para los vectores virales infecciosos varían de 10-100, o mas virions por dosis.

Los agentes terapéuticos pueden ser administrados mediante las vías parenteral, tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intrarterial, intracraneal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terpéutico. La ruta de administración mas típica de un agente inmunogénico es subcutánea aunque otras rutas pueden ser igualmente efectivas. La siguiente ruta mas común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección es mas típicamente llevada a cabo en el brazo o en los músculos de la pierna. En algunos métodos, los agentes son inyectados directamente en un tejido particular donde se han acumulado los depósitos, por ejemplo una inyección intracraneal. La inyección intramuscular o la infusión intravenosa se pre-

fieren para la administración de anticuerpos. En algunos métodos ciertos anticuerpos terapéuticos particulares son inyectados directamente al cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos son administrados como una composición o dispositivo de liberación sostenida , tal como el dispositivo Medipad™.

Los agentes de la invención pueden opcionalmente ser administrados en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente efectivos en el tratamiento de las enfermedades amiloidogénicas. En el caso de Alzheimer y el síndrome de Down, en los cuales los depósitos amiloideos ocurren en el cerebro, los agentes de la invención también pueden ser administrados en conjunto con otros agentes que incrementen el paso de los agentes de la invención a través de la barrera sangre-cerebro.

C. Composiciones Farmacéuticas

Los agentes de la invención son a menudo administrados como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo, es decir, y una variedad de otros componentes farmacéuticos aceptables. Ver Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)). La forma preferida depende del modo en que se intenta administrar y la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación que se desea, portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos o diluyentes, que se definen como los vehículos normalmente usados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, una solución salina apagada con fosfatos fisiológica, una solución de Ringer, una solución de dextrosa, y una solución de Hank. Además la composición farmacéutica o formulación también podría incluir otros portadores, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos no inmunogénicos y sus sismilares.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas grandes metabolizadas lentamente tales como las proteínas, polisacáridos como el chitosan, ácidos poliácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (tal como la sefarosa funcionalizada de latex (TM), azarosa, celulosa, y similares) aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos y agregados lípidos (tal como gotitas de aceite o liposomas). Adicionalmente estos portadores pueden funcionar como agentes inmunoestimuladores (es decir adyuvantes).

Para la administración parenteral, los agentes de la invención pueden ser administrados como dosis inyectables

de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológico aceptable con un portador farmacéutico que pueda hacer un líquido estéril tal como el agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación o de emulsificación, espumantes, sustancias para disminuir el pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son aquellos del origen de carbohidratos, animal, vegetales o sintéticos, por ejemplo aceite de maní, aceite de soya y aceite mineral. En general los glicoles tales como el glicol propileno o glicol polietileno son los portadores líquidos que se prefieren, en particular para soluciones inyectables. Los anticuerpos pueden ser administrados en una inyección o de una preparación para implante, la cual puede ser formulada de tal manera que permita una liberación sostenida del ingrediente activo, un composición de ejemplo comprende un anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en un apagador acuoso que consiste de 50 mM L-histidina, 150 mM NaCl, ajustado a un pH 6.0 con HCl.

Típicamente, las composiciones son preparadas como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones; las formas sólidas adecuadas para la solución en o la suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección también pueden ser preparadas. La preparación también puede ser emulsificada o encapsulada en liposomas o micropartículas tales como polilactidos, poliglicolidos o copolimeros para un efecto adyuvante mejorado, como se discute arriba (ver Langer, Science 249:1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97 (1997)). Los agentes de esta invención pueden ser administrados en la forma de una inyección localizada o una preparación de implante, la cual puede ser formulada de manera tal que permita una liberación sostenida o pulsada de ingrediente activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen las formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdermales. Para los supositorios los aglutinantes y los portadores incluyen por ejemplo polialquileno, glicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden ser formados a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0.5% a 10%, de preferencia 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como los grados farmacéuticos del manitol, lactosa, levadura, el estereato de magnesio, la sacarina de sodio, la celulosa, y el carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen

ciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% del ingrediente activo, de preferencia 25%-70%.

La aplicación tópica puede resultar en una administración transdermal o intradermal.

La administración tópica puede ser facilitada mediante la co-administración de la gente con una toxina del cólera o derivativos destoxificados o subunidades de la misma u otras toxinas bacteriales similares (ver Glenn et al., Nature 391:851 (1998)). La co-administración puede ser lograda usando los componentes como una mezcla o como moléculas enlazadas obtenidas por un enlace cruzado químico o por expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, la administración transdermal puede ser lograda usando un camino sobre la piel o usando transferosomas (Paul et al., Eur. J. Immunol. 25:3521 (1995); Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368:201-15 (1998)).

III. Monitoreando el Curso del Tratamiento

La invención brinda métodos de monitorear el tratamiento en un paciente que sufre de o que es susceptible a la enfermedad de Alzheimer, es decir para monitorear el curso del tratamiento que se está administrando al paciente. Los métodos se pueden usar para monitorear tanto el tratamiento terapéutico en pacientes sintomáticos como el tratamiento profiláctico en pacientes asintomáticos. En particular, los métodos son útiles para monitorear la inmunización pasiva (por ejemplo midiendo el nivel de anticuerpo administrado).

Algunos métodos involucran determinar un valor de base, por ejemplo de un nivel de anticuerpo o perfil en un paciente, antes de administrar una dosificación del agente, y comparar éste con un valor para el perfil o nivel después del tratamiento. Un aumento significativo (es decir mayor que el margen típico de error experimental en medidas repetidas de la misma muestra, expresada como una desviación estándar de la media de dichas mediciones) en valor del nivel o el perfil señala un resultado positivo del tratamiento (es decir que la administración del agente a logrado la respuesta deseada). Si el valor de la respuesta inmune no cambia significativamente, o decrece, se indica un resultado negativo del tratamiento.

En otros métodos, un valor de control (es decir una desviación media y estándar) del nivel o perfil se determina para una población de control. Típicamente los individuos en la población de control no han recibido tratamiento previo. Los valores medidos del nivel o perfil en un paciente después de la administración de un agente terapéutico son entonces comparados con el valor de control. Un in-

cremento significativo relativo al valor de control (es decir mayor que la desviación estándar de la media) señala un resultado del tratamiento positivo o suficiente. Una falta de incremento significativo o un decrecimiento señala un resultado del tratamiento negativo o insuficiente. La administración del agente es generalmente continuada mientras el nivel siga creciendo con relación al valor de control. Como antes la obtención de una meseta relativa a los valores de control es un indicador de que la administración del tratamiento podría ser descontinuada o reducida en dosis y/o frecuencia.

En otros métodos, un valor de control de nivel o perfil (por ejemplo una desviación media y estándar), se determina a partir de una población de control de individuos que han pasado el tratamiento con un agente terapéutico y cuyos niveles o perfiles se han puesto en una meseta la respuesta al tratamiento. Los valores medidos de los niveles o perfiles en un paciente son comparados con el valor de control. Si el valor medido en el paciente no es significativamente diferente (es decir mas que una desviación estándar) del valor de control, el tratamiento puede ser descontinuado. Si el nivel del paciente esta significativamente por debajo del valor de control se garantiza la administración continua del agente. Si el nivel en el paciente persiste por debajo del valor de control entonces podría ser indicado un cambio en el tratamiento.

En otros métodos, un paciente que actualmente no recibe tratamiento pero que ha pasado por un curso previo del tratamiento es monitoreado para revisar los niveles de anticuerpo o perfiles para determinar si se requiere reiniciar el tratamiento. El nivel medido o el perfil en el paciente puede ser comparado por un valor previamente adquirido en el mismo paciente luego de un curso de tratamiento previo. Un decrecimiento significativo con relación a la medida previa (es decir mayor que el margen típico de error en medidas repetidas de la misma muestra) es una indicación de que el tratamiento puede reiniciarse. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control (la media mas la desviación estándar) determinado en una población de pacientes luego de haber pasado el curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en un paciente puede ser comparado con un valor de control en poblaciones de pacientes tratados profilácticamente que permanecen libres de los síntomas de la enfermedad, o poblaciones de pacientes tratados terapéuticamente que muestran mejora en las características de la enfermedad. En todos estos casos, un decrecimiento significativo con relación al nivel de control (es decir mas que la des-

viación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe ser reiniciado en el paciente.

El tejido de muestra para el análisis es típicamente sangre, plasma, suero, fluido mucoso o fluido cerebro espinal del paciente. La muestra es analizada por ejemplo para ubicar sus niveles o perfiles de anticuerpo en el péptido Aβ, es decir, los niveles o perfiles de anticuerpos humanizados. Los métodos ELISA de detectar anticuerpos específicos al Aβ son descritos en la sección de ejemplo. En algunos métodos, el nivel o perfil de un anticuerpo administrado se determina utilizando un ensayo de limpieza, por ejemplo en un ensayo de fagocitosis in vitro, como se describe aquí. En dichos métodos, una muestra de tejido del paciente que está siendo examinado se pone en contacto con depósitos amiloideos (por ejemplo de un ratón PDAPP) y células fagocíticas que están llevando receptores Fc. La limpieza subsecuente del depósito amiloideo es entonces monitoreada. La existencia y el alcance de la respuesta de limpieza brinda una indicación de la existencia y nivel de los anticuerpos efectivos para limpiar Aβ en el tejido de muestra en el paciente que se esta examinando.

El perfil del anticuerpo luego de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpo seguida de una caída exponencial. Sin mayor dosificación, la caída se acerca a los niveles del pre-tratamiento dentro de un periodo de días a meses dependiendo de la vida media del anticuerpo administrado. Por ejemplo la vida media de algunos anticuerpo humanos esta en el orden de los 20 días.

En algunos métodos un mecimiento de la línea de base del anticuerpo Aβ en el paciente se hace antes de la administración, se hace una segunda medición inmediatamente después de determinar el pico del nivel del anticuerpo, y una o mas mediciones se hacen a intervalos para monitorear la caída de los niveles de anticuerpo. Cuando el nivel de anticuerpo a declinado hasta la línea base o a un porcentaje predeterminado de la línea base menos el (pico por ejemplo al 50%, 25% o 10%) se administra una dosis adicional de anticuerpo. En algunos métodos, los niveles de pico y los niveles medidos subsecuentemente menos el fondo son comparados con niveles de referencia que se han determinado previamente para constituir un régimen de tratamiento beneficioso profiláctico o terapéutico en otros pacientes. Si el nivel de anticuerpo medido es significativamente menor a un nivel de referencia (por ejemplo menos que la media menos una desviación estándar del valor de referencia en la población de pacientes que se benefician del tratamiento) es

indicada la administración de una dosificación adicional de anticuerpo.

Los métodos adicionales incluyen el monitoreo, durante el curso del tratamiento, cualquier síntoma fisiológicamente reconocido en esta ciencia (físico o mental) en los cuales se basa rutinariamente los investigadores o los médicos para diagnosticar o monitorear las enfermedades amiloidogénicas (por ejemplo la enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, uno puede monitorear la dificultad cognitiva éste último es un síntoma de la enfermedad de Alzheimer y del síndrome de Down pero también puede ocurrir sin otras características de cualquiera de estas enfermedades. Por ejemplo la dificultad cognitiva puede ser monitoreada determinando el puntaje de una persona en un Examen de Estado Mini Mental de acuerdo con las convenciones a través del curso del tratamiento.

C. Kits

La invención además provee kits para realizar los métodos de monitoreo que se describen anteriormente. Típicamente dichos kits contienen un agente que específicamente se une a anticuerpos del Aβ. El kit también puede incluir un titulador. Para la detección de anticuerpos del Aβ, el titulador es típicamente en forma de anticuerpos titulados anti-ideotípicos. Para la detección de anticuerpos, el agente puede ser suministrado preunido a una fase sólida, tal como las positas de un plato microtitulador. Los kits también contienen típicamente etiquetas que brindan direcciones para el uso del mismo. El etiquetado también podría incluir una cartilla u otro régimen de correspondencia que se correlacione a los niveles de medición contra los niveles de anticuerpos al Aβ. El término "etiquetado" se refiere a cualquier material escrito o grabado que esté adherido o que de alguna otra manera acompañe a un kit en cualquier momento durante su manufactura, transporte, venta o uso. Por ejemplo, el término etiquetado incluye las hojas y catálogos de anuncios, los materiales de empaque, las instrucciones, audio o videocasetes, discos de computadora, así como la escritura directamente impresa sobre los kits.

La invención también provee kits de diagnóstico, por ejemplo, de investigación, detección y/o diagnóstico (por ejemplo para realizar las imágenes in vivo). Dichos kits típicamente contienen un anticuerpo para unirse a un epítope de Aβ, preferiblemente dentro de los residuos 1-10. Preferiblemente, el anticuerpo es titulado o un reagente secundario de titulación viene incluido en el kit. De preferencia, el kit esta etiquetado con instrucciones para rea-

lizar la aplicación que se intenta, por ejemplo, para llevar a cabo un ensayo de imágenes in vivo. Anticuerpos de ejemplo son aquellos que se describen aquí.

D. Imagen In vivo

La invención provee métodos para producir imágenes in vivo de depósitos amiloideos en un paciente. Dichos métodos son útiles para diagnosticar o confirmar la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer o la susceptibilidad a la misma. Por ejemplo, los métodos pueden ser usados en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene depósitos amiloideos anormales, entonces el paciente está probablemente sufriendo de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos también pueden ser usados en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de amiloide indican susceptibilidad a una enfermedad sintomática futura. Los métodos también son útiles para monitorear el progreso de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados de sufrir de Alzheimer.

Los métodos trabajan por medio de la administración de un reagente, tal como un anticuerpo que se une al Aβ, al paciente y luego detectando el agente después de que se ha unido. Los anticuerpos preferidos se unen a los depósitos Aβ en un paciente sin unirse a los polipéptidos APP de tamaño completo. Los anticuerpos que se unen a un epítope de Aβ dentro de los aminoácidos 1-10 son particularmente preferidos. En ciertos métodos, el anticuerpo se une a un epítope dentro de los aminoácidos 7-10 de Aβ. Dichos anticuerpos típicamente se unen sin inducir una respuesta de limpieza substancial. En otros métodos, el anticuerpo se une a un epítope dentro de los aminoácidos 1-7 de Aβ. Dichos anticuerpos típicamente se unen e inducen una respuesta de limpieza al Aβ. Sin embargo la respuesta de limpieza puede ser evitada por medio del uso de fragmentos de anticuerpo a los que le falta la región constante de longitud completa, tales como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir tanto como reagente de tratamiento como de diagnóstico. En general, los anticuerpos que se unen a epítopes de terminal C al residuo 10 de Aβ, no muestran una señal tan fuerte como la de los anticuerpos que se unen a epítopes dentro de los residuos 1-10, presumiblemente debido a que los epítopes de terminal C son inaccesibles en los depósitos amiloideos. En consecuencia, dichos anticuerpos son los menos preferidos.

Los reagentes de diagnóstico pueden ser administrados mediante inyección intravenosa al cuerpo del paciente, o directamente al cerebro mediante la inyección intracraneal

o perforando un agujero a través del cráneo. La dosis de reagente debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente el reagente es titulado, aunque en algunos métodos, el agente primario con afinidad de Aβ no está titulado y un segundo agente titulador se usa para unir al primer reagente. Escoger el titulador depende de los medios de detección. Por ejemplo, un titulador fluorescentes es adecuado para la detección óptica. El uso de tituladores para magnéticos es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Tituladores radioactivos pueden también ser detectados usando PET o SPECT.

La diagnosis es llevada a cabo mediante la comparación del número, tamaño y/o intensidad de los loci titulados, a los correspondientes valores de línea base. Los valores de línea base pueden representar los valores medios en una población de individuos no enfermos. Los valores de línea base también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de línea base pueden ser determinados en un paciente antes de empezar el tratamiento, y los valores medidos luego de ello ser comparados con los valores de línea base. Una disminución en los valores relativo a las señales de línea base son una respuesta positiva a tratamiento.

La presente invención será descrita en más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes

EJEMPLOS

Ejemplo I. Eficacia Terapéutica de los Anticuerpos Anti-Aβ; mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12 y pAb Aβ1-42

Este ejemplo muestra la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales y policlonales del Aβ para inhibir la acumulación de Aβ en el cerebro de los ratones transgénicos heterocigóticos.

A. Diseño de Estudio

Sesenta ratones transgénicos PPADP heterócigos, machos y hembras, de edades 8.5 a 10.5 meses fueron obtenidos del Laboratorio Charles River. Los ratones fueron agrupados en 6 grupos para ser tratados con diversos anticuerpos dirigidos al Aβ. Los animales fueron distribuidos para hacer cuadrar el género, la edad, la ascendencia y la fuente de los

animales dentro de los grupos tan cercanamente como fue posible. La tabla 2 muestra el diseño Experimental.

Tabla 2: Diseño Experimental

Grupo de Tratamiento	N[a]	Anticuerpo de Tratamiento	Especificidad del Anticuerpo	Isotipo del Anticuerpo
1	9	none (PBS alone)	NA[b]	NA
2	10	Polyclonal	Aβ1-42	Mixed
3	0	mAb[d] 2H3	Aβ1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	Aβ3-7	IgG1
5	6	mAb 266	Aβ13-28	IgG1
6	8	mAb 21F12	Aβ33-42	IgG2a

a. Número de ratones en grupo al terminar el experimento. Todos los grupos empezaron con 10 animales..
b. NA: no aplicable
c. policlonal de ratón: anti agregado Aβ42
d. mAb: anticuerpo monoclonal

Como se muestra en la Tabla 2, los anticuerpos incluían cuatro anticuerpos monoclonales específicos del Aβ de murina, 2H3 (dirigido a los residuos Aβ 1-12), 10D5 (dirigidos a los residuos Aβ 3-7), 266 (dirigidos a los residuos Aβ 13-28 y se unen al soluble pero no al agregado AN1792), 21F12 (dirigido a los residuos Aβ 33-42). Un quinto grupo fue tratado con una fracción de anticuerpo policlonal específico Aβ (logrado por inmunización con AN1792 agregada). El grupo de control negativo recibió el diluyente PBS solo sin anticuerpo.

B. Monitoreando el Curso del Tratamiento

Los anticuerpos monoclonales fueron inyectados en una dosis de alrededor de 10 mg/kg (asumiendo que los ratones pesaban 50g). Tituladores de anticuerpo fueron monitoreados durante las 28 semanas de tratamiento. Se administró inyecciones intraperitonealmente cada 7 días en promedio para mantener la titulación anti- Aβ por encima de 1000. Aunque se midió titulaciones menores para el mAb 266 dado que no se une bien al AN1792 agregado usado como el antígeno de captura en el ensayo, se mantuvo la misma programación de

dosis para todo el grupo. El grupo que recibió el anticuerpo monoclonal 2h3 fue descontinuado durante las primeras tres semanas dado que el anticuerpo se limpió demasiado rápido in vivo.

Para la determinación de los tituladores anticuerpo, un subconjunto de tres ratones escogidos al azar de cada grupo fueron sangrados justo antes de cada inoculación intraperitonial, para un total de 30 sangradas. Los tituladores de anticuerpo fueron medidos como anticuerpos unidos al Aβ1-42 usando un sándwich ELISA con placas plásticas multipositos revestidas con Aβ1-42 como se describe en detalle en Materiales Generales y Métodos. La titulación media de cada sangrado se presenta en la Tabla 3 para el anticuerpo policlonal y para los monoclonales 10D5 y 21F12.

Tabla 3:

semanas 21F12	21F12	Semanas 10D5	10D5	semanas poly	poly
0.15	500	0.15	3000	0.15	1600
0.5	800	0.5	14000	0.5	4000
1	2500	1	5000	1	4500
1.5	1800	1.1	5000	1.5	3000
2	1400	1.2	1300	2	1300
3	6000	2	3000	3	1600
3.5	550	3	4000	3.5	650
4	1600	3.5	500	4	1300
5	925	4	2400	5	450
6	3300	5	925	6	2100
7	4000	6	1700	7	1300
8	1400	7	1600	8	2300
9	1900	8	4000	9	700
10	1700	9	1800	10	600
11	1600	10	1800	11	600
12	1000	11	2300	12	1000
13	1500	12	2100	13	900
14	1300	13	2800	14	1900
15	1000	14	1900	15	1200
16	1700	15	2700	16	700
17	1700	16	1300	17	2100
18	5000	17	2200	18	1800
19	900	18	2200	19	1800
20	300	19	2500	20	1200
22	1750	20	980	22	1000
23	1600	22	2000	23	1200
24	1000	23	1000	24	675
25	1100	24	850	25	850
26	2250	25	600	26	1600
27	1400	26	1100	27	1900
28		27	1450	28	
		28			

Los tituladores promediaron alrededor de 1000 durante este periodo de tiempo para la preparación con anticuerpo policlonal y estuvieron ligeramente por encima de este nivel para los animales tratados con 10D5 y 21F12.

El tratamiento fue continuado durante un periodo de seis meses para un total de 196 días. Los animales fueron eutanizados una semana después de la dosis final.

C. Niveles de Aβ y APP en el Cerebro

Luego de alrededor de seis meses de tratamiento con las diversas preparaciones de anticuerpo anti- Aβ, se retiró los cerebros de los animales después de una perfución salina.

Un hemisferio fue preparado para un análisis inmunohistoquímico y el segundo fue usado para la cuantifica-

ción de los niveles de Aβ y APP. Para medir las concentraciones de las diversas formas del péptido beta amiloide y de la proteína precursora amiloidea (APP), el hemisferio fue disecado y homogenizado en las regiones hipocampal, cortical y cerebelar y preparadas en guanidina 5M. Estas fueron diluidas serialmente y el nivel del péptido amiloide o APP fue cuantificado por comparación a una serie de diluciones de estándares de péptido Aβ o APP de concentraciones conocidas en el formato ELISA.

Los niveles del total Aβ y de Aβ1-42 medidos mediante ELISA en los homogenados del cortex y de hipocampos y el nivel del total de Aβ en el cerebelo se muestran en las tablas 4,5 y 6 respectivamente. La concentración mediana del total de Aβ para el grupo de control inoculados con el PBS, fue 3.6 veces mayor en el hipocampo que en el cortex (una mediana de 63,389 ng/g de tejido hipocampal en comparación con 17,818 ng/g del cortex). El nivel mediano en el cerebelo del grupo de control (30.6 ng/g de tejido) fue mas de 2000 veces menor que en el hipocampo. Estos niveles son similares a aquellos previamente reportados para los ratones transgénicos PDAPP heterocigos de esta edad (Jonson-Wood et al., arriba).

En cuanto al cortex un grupo de tratamiento tuvo un nivel de mediana Aβ, medida como Aβ1-42, que diferia significantemente de la del grupo de control ($p < 0.05$), de aquellos animales que recibían el anticuerpo anti- Aβ policlonal como se muestra en la Tabla 4. El nivel mediano de Aβ1-42 fue reducido por 65% en comparación al control de este grupo de tratamiento. Los niveles de mediana de Aβ1-42 fueron también significativamente reducidos en 55% comparados al control en un grupo adicional de tratamiento, estos animales fueron dosificados con el mAb 10D5 ($p = 0.0433$).

Tabla 4

CORTEX

Grupo de Tratamiento	N[a]	Medianas						Medias	
		Total Aβ			Aβ42			Total Aβ	Aβ42
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value	P value	% Change	ELISA value	ELISA value
PBS	9	17818	NA[d]	NA	13802	NA	NA	16150+/ 7456[e]	12621+/ 5738
Polyclonal anti Aβ42	10	6160	0 0055	-65	4892	0 0071	65	5912+/-4492	4454+/ 3347
mAb 10D5	8	7915	0 1019	-56	6214	0 0433	-55	9695+/ 6929	6943+/ 3351
mAb 266	6	9144	0 1255	49	8481	0 1255	-39	9204+/ 9293	7489+/ 6921
mAb 21F12	8	15158	0 2898	15	13578	0 7003	2	12481+/ 7082	11005+/ 6324

Footnotes

a Numero de animales por grupo al final del experimento
b ng/g tejido
c Mann Whitney análisis
d NA no aplicable
e Desviación estándar

En el hipocampo, la reducción porcentual media del total Aβ asociado con el tratamiento con el anticuerpo anti-Aβ policlonal (50%, p = 0.0055) no fue tan grande como el que se observó en el cortex (65%) (Tabla 5). Sin embargo la magnitud absoluta de la reducción fue casi 3 veces mayor en el hipocampo que en el cortex, una reducción neta de 31,683 ng/g de tejido en el hipocampo contra 11,658 ng/g de tejido en el cortex. Cuando fueron medidos como el nivel de una forma mas amiloidogénica de Aβ, Aβ1-42, en lugar de cómo el total de Aβ, la reducción lograda con el anticuerpo policlonal fue significativa (p = 0.0025). Los niveles medios en los grupos tratados con el mAbs 10D5 y 266 fueron reducidos por 33% y 21% respectivamente.

Tabla 5

HIPPOCAMPUS									
Grupo de Tratamiento	N[a]	Medianas						Medias	
		Total Aβ			Aβ42			Total Aβ	Aβ42
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value	P value	% Change	ELISA value	ELISA value
PBS	9	63389	NA[d]	NA	54429	NA	NA	58351+/-13308[e]	52801+/-14701
Polyclonal anti-Aβ42	10	31706	0 0055	-50	27127	0 0025	-50	30058+/-22454	24853+/-18262
mAb 10D5	8	46779	0 0675	-26	36290	0 0543	-33	44581+/-18632	36465+/-17146
mAb 266	6	48689	0 0990	-23	43034	0 0990	-21	36419+/-27304	32919+/-25372
mAb 21F12	8	51563	0 7728	-19	47961	0 8099	-12	57327+/-28927	50305+/-23927

a Número de animales por grupo al final del experimento
b ng/g tejido
c Mann Whitney análisis
d NA no aplicable
e Desviación estándar

El Aβ total también fue medido en el cerebelo (Tabla 6). Los grupos dosificados con el anti- Aβ policlonal y el anticuerpo 266 mostraron significativas reducciones de los niveles del Aβ total (43% y 46%, p = 0.0033 y p = 0.0184, respectivamente) y el grupo tratado con 10D5 tuvo una reducción significativa cercana (29%, p = 0.0675).

Tabla 6

CEREBELLUM					
Grupo de Tratamiento	N[a]	Medianas			Medias
		Total Aβ			Total Aβ
		ELISA value[b]	P value[c]	% Change	ELISA value
PBS	9	30.64	NA[d]	NA	40.00+/-31.89[e]
Polyclonal anti-Aβ42	10	17.61	0.0033	-43	18.15+/-4.36
mAb 10D5	8	21.68	0.0675	-29	27.29+/-19.43
mAb 266	6	16.59	0.0184	-46	19.59+/-6.59
mAb 21F12	8	29.80	>0.9999	-3	32.88+/-9.90

a. Número de animales por grupo al final del experimento
b. ng/g tejido
c. Mann Whitney análisis
d. NA: no aplicable
e. Desviación estándar

La concentración de APP también fue determinada mediante ELISA en el cortex y el cerebelo de los ratones tratados con anticuerpo y los de control tratados con PBS. Dos ensayos de APP diferentes fueron utilizados. El pri,mero diseñado APP-α/FL, reconoce tanto el APP-alfa (α, la forma secretada de APP que ha sido embutida dentro de la secuencia Aβ), y las formas de longitud completa (FL) de APP, mientras que el segundo reconoce solamente APP-α. En contraste a la disminución asociada al tratamiento de Aβ en un

subconjunto de los grupos de tratamiento, los niveles APP permanecieron virtualmente inalterados en todos los que se trataron comparados con los animales de control. Estos resultados indican que las inmunizaciones con anticuerpos Aβ eliminan el Aβ sin eliminar el APP.

En resumen, los niveles Aβ se vieron significativamente reducidos en el cortex, hipocampo y cerebelo de los animales tratados con el anticuerpo policlonal en contra del AN1792. En menor escala los anticuerpos monoclonales a la región terminal amino de Aβ1-42, específicamente los aminoácidos 1-16 y 13-28 también mostraron efectos significativos en el tratamiento.

D. Análisis Histoquímico

La morfología de las placas Aβ-inmunoreactivas en los subconjuntos de cerebros de los grupos de ratones en tratamiento con PBS, Aβ42 policlonal, 21F12, 266 y 10D5 fue comparado cualitativamente a aquellos de estudios previos en los cuales se siguieron procedimientos de inmunización estándar con Aβ42.

La mayor alteración tanto en el alcance como en la apariencia de las placas amiloideas ocurrió en los animales inmunizados con el anticuerpo policlonal Aβ42. La reducción de la carga amiloidea, la morfología de la placa erosionada y la inmunoreactividad Aβ asociada a las células reflejó muy cercanamente los efectos producidos por el procedimiento de inmunización estándar. Estas observaciones soportan los resultados ELISA en los cuales se logró significativas reducciones tanto en el total de Aβ y Aβ42 mediante la administración del anticuerpo policlonal Aβ42.

En evaluaciones cualitativas similares, las placas amiloideas en el grupo 10D5 también fueron reducidas en número y apariencia con cierta evidencia de inmunoreactividad Aβ asociada a las células. En relación a los animales de tratamiento por control, la fracción policlonal Ig contra Aβ y uno de los anticuerpos monoclonales (10D5) redujo la carga de la placa en 93% y 81% respectivamente ($p < 0.005$). El 21F12 pareció tener un efecto relativamente modesto sobre la carga de placa. Los micrográficos del cerebro luego del tratamiento con $pAbA\beta_{1-42}$ muestran depósitos difusos y la ausencia de muchas de las placas grandes compactadas en el grupo tratado con $pAbA\beta_{1-42}$ en relación a los animales tratados para control.

E. Respuestas Linfoproliferativas

La linfoproliferación dependiente de Aβ fue medida usando células del bazo recolectadas ocho días después de la infusión de anticuerpos final. Las células recién culti-

vadas, 10^5 por posita, fueron cultivadas por 5 días en presencia de Aβ1-40 a una concentración de 5 μM por estimulación. Como control positivo, células adicionales fueron cultivadas con el mitógeno de la célula T, PHA, y como control negativo algunas células fueron cultivadas sin un péptido añadido.

Los esplenocitos de los ratones PDAP añejados e inmunizados pasivamente con diversos anticuerpo anti-Aβ fueron estimulados in vitro con AN1792 y las respuestas proliferativas y citóquinas fueron medidas. El prpósito de estos ensayos fue determinar si al inmunación pasiva facilitaba la presentación de antígeno, y por lo tanto sacar una impresión de las respuestas de la célula T específicas para el AN1792. Las respuestas no específicas proliferativas o citóquinas contra el AN1792 fueron observadas en ratones que fueron inmunizados pasivamente con los anticuerpos anti-Aβ.

Ejemplo II: Eficacia Terapéutica de los Anticuerpos Anti-Aβ: mAb 2H3, mAb 10D5, mAb 266, mAb 21F12, mAb 3D6, mAb 16C11 y pAb Aβ1-42

En un segundo estudio, el tratamiento con 10D5 fue repetido y dos anticuerpos anti-Aβ adicionales fueron probados, los monoclonales 3D6 (Aβ1-5) y 16C11 (Aβ33-42). Los grupos de control recibieron el PBS o un anticuerpo irrelevante empatado con el isotipo (TM2a). Los ratones fueron mayores (de 11.5 a 12 meses de edad heterocigotes) que en el estudio previo, de otro modo el diseño experimental fue lo mismo. Una vez mas, después de seis meses de tratamiento, el 10D5 redujo la carga de placa por mas de 80% en relación a los controles con PBS o con el anticuerpo empatado con el isotipo ($p = 0.003$). Uno de los otros anticuerpos contra el Aβ, 3D6, fue igualmente efectivo produciendo una reducción de 86% ($p = 0.003$). En contraste, el tercer anticuerpo contra el péptido 16C11, no logró tener ningún efecto sobre la carga de placa. Hallazgos similares fueron obtenidos mediante las mediciones de Aβ42 con ELISA.

Estos resultados demuestran que la respuesta de un anticuerpo contra el péptido Aβ, en la ausencia de la célula T de la inmunidad, es suficiente para disminuir la deposición amiloidea en los ratones PDAPP, pero que no todos los anticuerpos anti-Aβ son igualmente eficaces. Los anticuerpos dirigidos a los epítopes comprendiendo los aminoácidos 1-5 o 3-7 de Aβ son particularmente eficaces. En resumen, se puede demostrar que los anticuerpos administrados pasivamente contra el Aβ (por ejemplo inmunización pasiva)) reduce la extensión de la placa de deposición en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo III: Monitoreo de la Unión de Anticuerpos en el CNS

Este ejemplo demuestra que cuando se mantienen concentraciones modestas en el suero (25 a 70 µg/ml), los anticuerpos lograron acceso al CNS a niveles suficientes para decorar las placas beta-amiloidea.

Para determinar si los anticuerpos contra el Aβ podrían estar actuando directamente dentro del CNS, se examinó cerebros tomados de los ratones remojados en solución salina al final del Ejemplo II para buscar la presencia de anticuerpos administrados periféricamente. Secciones no fijadas criostáticas del cerebro fueron expuestas a un reagente fluorescente en contra de la inmunoglobulina de ratón (el cuerpo anti-ratón IgG-Cy3). Las placas dentro de los cerebros de los grupos tratados con 10D5 y 3D6 estuvieron fuertemente decoradas con anticuerpo, mientras que no había coloración en el grupo del 16C11. Para revelar la extensión completa de la deposición de placa se hizo inmunoreaccionar en primer lugar secciones seriales de cada cerebro con un anticuerpo anti- Aβ, y luego con el reagente secundario. Después de la administración periférica los grupos 10D5 y 3D6 lograron el acceso a la mayoría de las placas dentro del CNS. La carga de placa se vio grandemente reducida en estos grupos de tratamiento en comparación al grupo 16C11. La entrada del anticuerpo al CNS no se debió a una filtración anormal de la barrera sangre-cerebro ya que no hubo incremento en la permeabilidad vascular según la medida de Evans Blue en los ratones PDAPP. Además, la concentración de anticuerpo en el parenquima del cerebro de los ratones PDAPP envejecidos fue la misma como en los ratones no transgénicos, representando 0.1% de la concentración del anticuerpo en el suero (sin tomar en cuenta el isotipo).

Estos datos indican que los antibióticos administrados periféricamente pueden entrar el CNS donde pueden directamente activar la limpieza del amiloide. Es probable que el 16C11 también tuvo acceso a las placas pero no pudo unirse.

Ejemplo IV: Ensayo Ex vivo para Filtrar la Actividad de un Anticuerpo contra los Depósitos Amiloideos

Para examinar el efecto de los anticuerpos sobre la limpieza de las placas, establecimos un ensayo ex vivo en el cual se cultivó células primarias microgliales con secciones criostáticas no fijadas tanto de cerebro de ratón PDAPP y de humanos AD. Se obtuvo células microgliales de las cortezas cerebrales de ratones recién nacidos DBA/2N (1-3 días). Las cortezas fueron disociadas mecánicamente en

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma) con 50 µg/ml ADNse I (Sigma). Las células disociadas fueron filtradas con un cernidor de celdas de 100 µm (Falcon), y centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. La pelotita fue resuspendida en un medio de crecimiento (alta glucosa DMEM, 10% FBS, 25 ng/ml de rmGM-CSF), y las células fueron plateadas a una densidad de dos cerebros por frasco de cultivo de plástico T-75. Después de 7-9 días, los frascos fueron rotados en un agitador orbital a 200 rpm por 2 horas a 37ºC. La suspensión de células fue centrifugada a 1000 rpm y resuspendida en el medio de ensayo.

Secciones criostáticas de 10 µm de cerebro de ratón PDAPP o humano AD (intervalo post-mortem < 3 horas) fueron montados por calentamiento sobrecubiertas redondas de vidrio revestidas con poli-lisina y colocadas en positas de platos de cultivo de 24 posas. Las cubiertas fueron enjuagadas dos veces con el medio de ensayo que consistía de H-SFM (un medio libre de cero de hibridoma, Gibco BRL) con 1% de FBS, glutamina, penicilina/streptomicina, y 5ng/ml rmGM-CSF (R&D). Anticuerpos de control o anticuerpos anti-Aβ fueron añadidos en concentraciones de 2x (5 µg/ml final) por una hora. Las células microgliales fueron entonces alimentadas a una densidad de 0.8x 10^6 de células/ml en el medio de ensayo. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora humidificada (37ºC, 5%CO_2) por 24 horas o mas. Al final de la incubación, los cultivos fueron fijados con 4% de formol y permeabilizados con 0.1% de Triton-X100. Las secciones fueron coloreadas con 3D6 biotinilado seguido de estreptavidina/Cy3 conjugado (Jackson ImmunoResearch). Las células microgliales exógenas fueron visualizadas mediante una coloración nuclear (DAPI). Los cultivos fueron observados con un microscopio fluorescente invertido (Nikon, TE300) y se tomaron fotomicrográficos con una cámara digital APOT usando el software SPOT (instrumentos de diagnóstico). Para el análisis de coagulación Western, los cultivos fueron extraídos en 8M de urea, diluidos 1 a 1 en un apagador de muestra de tricina y cargados dentro de un gel de tricita de 16% (Novex). Luego de ser transferidos al inmobilon, los coagulos fueron expuestos a 5 µg/ml del pabAβ seguidos por un anticuerpo anti-ratón conjugado HRP, y revelados con ECL (Amersham).

Cuando se realizó el ensayo con secciones de cerebro PDAPP en la presencia de 16C11 (uno de los anticuerpos contra el Aβ que no fue eficaz in vivo), las placas β-amiloideas permanecieron intactas y no se observó fagocitosis. En contraste, cuando se cultivó secciones adyacentes en presencia de 10 de 5, los depósitos amiloideos desaparecieron grandemente y las células microgliales mostraron nu-

merosas vesículas gacocíticas conteniendo Aβ. Se obtuvó resultados idénticos con secciones del cerebro AD; el 10D5 indujo fagocitosis de las placas AD, mientras que el 16C11 fue inefectivo. Además, el ensayo brindó resultados comparables cuando se llevó a cabo con células microgliales humanas o de ratón, y con anticuerpos de ratón, conejo o primate contra el Aβ.

La Tabla 7 compara la unión de Aβ contra la fagocitosis para diversas especificidades de unión de anticuerpo. Se puede observar que los anticuerpos que se unen a epítopes dentro de aa 1-7 se unen y limpian los depósitos amiloideos, mientras que los anticuerpos que se unen a los epítopes dentro de los aminoácidos 4-10 se unen sin limpiar los depósitos amiloideos. Los anticuerpos que se unen a los epítopes de terminal C al residuo 10 ni se unen ni limpian los depósitos amiloideos.

Tabla 7: Análisis de Especificidad al Epítope

	Antibody epitope	isotype	Staining	Phagocytosis
N-Term				
mab				
3D6	1-5	IgG2b	+	+
10D5	3-7	IgG1	+	+
22C8	3-7	IgG2a	+	+
6E10	5-10	IgG1	+	-
14A8	4-10	rat IgG1	+	-
aa 13-28				
18G11	10-18	rat IgG1	-	-
266	16-24	IgG1	-	-
22D12	18-21	IgG2b	-	-
C-Term				
2G3	-40	IgG1	-	-
16C11	-40/-42	IgG1	-	-
21F12	-42	IgG2a	-	-
Immune serum				
rabbit (CFA)	1-6		+	+

mouse (CFA)	3-7	+	+
mouse (QS-21)	3-7	+	+
monkey (QS-21)	1-5	+	+
mouse (MAP1-7)		+	+

La Tabla 8 muestra resultados obtenidos con diversos anticuerpos contra el Aβ comparando sus habilidades para inducir fagocitosis en los ensayos ex vivo y para reducir la carga de placa in vivo en estudios de transferencia pasiva. Aunque el 16C11 y el 21F12 se unieron al péptido Aβ agregado sintético con gran avidez, estos anticuerpos no pudieron reaccionar con las placas amiloideas β en secciones del cerebro no fijadas, no pudieron activar la fagocitosis en el ensayo ex vivo y no fueron eficaces in vivo. El 10D5, 3D6 y el anticuerpo policlonal contra el Aβ fueron activos en las tres mediciones. Estos resultados demuestran que la eficacia in vivo se debe a la limpieza mediada por el anticuerpo en forma directa de las placas dentro del CNS y que el ensayo ex vivo es predictivo de la eficacia in vivo.

Tabla 8: El ensayo *ex vivo* como predictor de la eficacia *in vivo*

Antibody	Isotype	Avidity for aggregated Aβ (pM)	Binding to β-amyloid plaques	*Ex vivo* efficacy	*In vivo* efficacy
monoclonal					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
polyclonal					
1-42	mix	600	+	+	+

El mismo ensayo ha sido usado para evaluar la actividad de limpieza de un anticuerpo contra un fragmento de sinucleina al que nos referimos como NAC. La sinucleina ha sido mostrada como que es una proteína asociada a la placa

amiloidea. Un anticuerpo a la NAC se puso en contacto con una muestra de tejido cerebral conteniendo placa amiloidea y células microgliales como antes. Se usó suero de conejo como control. El monitoreo subsecuente mostró una marcada reducción en el número y en el tamaño de las placas indicativas de la actividad de limpieza del anticuerpo.

Se usó microscopia confocal para confirmar que el Aβ fue internalizado durante el curso del ensayo ex vivo. En la presencia de anticuerpos de control las células microgliales exógenas permanecieron en un plano confocal por encima del tejido, no hubo vesículas fagocíticas conteniendo Aβ, y las placas permanecieron intactas dentro de la sección. En presencia del 10D5, casi todo el material de placa fue contenido en vesículas dentro de las células microgliales exógenas. Para determinar el destino del péptido internalizado, se extrajo cultivos tratados con 10D5 con 8M urea en diversos puntos de tiempo, y se examinaron mediante el análisis de coágulos Western. Después de una hora, cuando aún no había ocurrido fagocitosis, la reacción con un anticuerpo policlonal contra el Aβ reveló una fuerte banda 4kD (correspondiente a un péptido Aβ). La inmunoreactividad Aβ decreció en el día 1 y estuvo totalmente ausente para el día 3. Por lo tanto la fagocitosis mediada por anticuerpos de Aβ conduce a su degradación.

Para determinar si la fagocitosis en el ensayo ex vivo fue mediada por Fc, se preparó fragmentos F(ab')2 del anticuerpo Aβ 3D6. Aunque los fragmentos F(ab')2 retuvieron su total habilidad para reaccionar con las placas, no pudieron activar la fagocitosis por las células microgliales. Además la fagocitosis con el anticuerpo completo pudo ser bloqueada por medio de un reagente contra los receptores Fc de murina (anti-CD16/32). Estos datos indican que la limpieza in vivo del Aβ ocurre a través de una fagocitosis mediada por el receptor Fc.

Ejemplo V: Paso de Anticuerpos a través de la Barrera Sangre-Cerebro

Este ejemplo determina la concentración de anticuerpo administrado al cerebro después de una inyección intravenosa en el tejido periférico de ratones normales o PDAPP. Luego del tratamiento, los ratones PDAPP o normales de control fueron remojados en 0.9% de NaCl. Secciones cerebrales (hipocampo o cortex) fueron disecadas y rápidamente congeladas. El cerebro fue homogenizado en inhibidores de 0.1% triton + proteasa. Se detectó inmunoglobulina en los extractos por medio de ELISA. Los cuerpos anti-ratón IgG F(ab')2 fueron recubiertos sobre una placa RIA como agente

de recaptura. El suero de los extractos de cerbro fue incubado por una hora. Los isotipos fueron detectados con un anti-ratón IgG1-HRP o IgG2a-HRP o IgG2b-HRP (Caltag). Los anticuerpos, sin tomar en cuenta el isotipo, estuvieron presentes en el CNS en una concentración que es 1:1000 la que se encuentra en la sangre. Por ejemplo, cuando la concentración de IgG1 fue tres veces la de Igg2a en la sangre, era tres veces IgG2a en el cerebro también, ambas estuvieron presentes en 0.1% de sus respectivos niveles en la sangre. Este resultado se observó tanto en los ratones transgénicos como en los ratones no transgénicos indicando que el PDAPP no tiene una fuga singular en la barrera sangre-cerebro.

Ejemplo VI: Clonación y Secuenciación de las Regiones Variables del 3D6 del Ratón

Clonación y Análisis de Secuencia del 3D6 VH. La región variable de cadena pesada VH del 3D6 fue clonada por medio de RT-PCR usando mRNA preparada a partir de células hibridomas por dos métodos independientes. En el primero ejemplos de consenso fueron empleados para el péptido directriz de la región VH junto con la iniciación de traducción del codon como el imprimante 5' (ADN #3818-3829), y un imprimante 3' específico para regiones constantes g2b (ADN #3832). Las secuencias del producto PCR amplificado, así como de múltiples clones independientemente derivados, estuvieron en completo acuerdo entre sí. Como una prueba adicional de la secuencia de la región 3D6 VH, el resultado fue confirmado mediante la secuenciación de un fragmento VH obtenido por la metodología 5' RACE RT-PCR y el imprimante específico 3' g2b (ADN #3832). Nuevamente, la secuencias fue derivada del producto PCR, así como de múltiples clones aislados independientemente. Ambas secuencias se encuentran en completo acuerdo entre sí, (con la excepción de la substitución del V8I en la región directriz del 5' RACE) indicando que las secuencias se derivan del mRNA codificando la región VH del 3D6. El nucleótido (SEQ ID NO:3) y la secuencia aminoácido (SEQ ID NO:4) de la región Vh del 3D6 son presentadas en la Tabla 9 y en la Figura 2, respectivamente.

Tabla 9: Secuencia Nucleótida VH 3D6 de ratón

ATGAACTTCGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA
AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGAAT
TCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTGCATCCATTAGGAGTGGTGGTGGTAGAACCTACTA
TTCAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTGT
ACCTGCAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTGTCAGATAT
GATCACTATAGTGGTAGCTCCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACT (SEQ ID NO:3)

*Se subraya el péptido directriz.

Análisis de Clonación y Secuencia de 3D6 VL. La región variable VL de la cadena ligera del 3D6 fue clonada de manera análoga a la de la región VH. En la primera prueba se designó un juego de imprimante de consenso para amplificación de regiones VL de murina como sigue: 5' imprimantes (ADN #3806-3816) fueron diseñados para hibridizar la región VL acompañando la iniciación de traducción codon y un 3' imprimante (ADN #3817) fue específico para el flujo hacia abajo de la región Ck de murina de la región de unión V-J. El análisis de secuencia ADN del fragmento PCR, así como los clones derivados independientemente que se aislaron usando este juego de imprimante de cadena ligera, revelaron que el cADN obtenido fue derivado de un mensaje de arreglo no funcional a medida que la secuencia continuó la mutación de cuadros entre la unión de la región V-J.

En un segundo ensayo, se empleó 5'RACE para clonar un segundo VL codificando cADN. El análisis de secuencia de este producto (consenso 11) demostró que codificaba un mRNA funcional. Por lo tanto, se puede concluir que la secuencia codifica la cadena ligera mRNA correcta del 3D6. El nucleótido (SEQ ID NO:1) y la secuencia aminoácido (SEQ ID NO:2) de la región VL de 3D6 son presentados en la Tabla 10 y en la Figura 1, respectivamente.

Tabla 10: Secuencia Nucleótida VL 3D6 de ratón

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGG
TTATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCT

CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAAT
TGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACT
GGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTGA
AAATCAGCAGAATAGAGGCTGAGGATTTGGGACTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACAT
TTTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:1)

*Se subraya el péptido directriz.

A partir del terminal N y el terminal C tanto las cadenas ligera como pesada comprenden los dominios FR1, CD1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio esta de acuerdo con la convención numérica de Rabat et al., mas arriba.

La Expresión del Anticuerpo Quimérico 3D6: Las regiones de cadena variable ligera y pesada fueron reingenieradas para codificar secuencias de sección de donante corriente abajo de las uniones VDJ o VJ respectivas, y clonadas en vectores de expresión mamífera pCMV-hγ1 para la cadena pesada, pCMV-hκ1 para la cadena ligera. Estos vectores codifican las regiones constantes humanas γ1 y CK como fragmentos exónicos corriente abajo del casete de la región variable insertada. Luego de la verificación de secuencia los vectores de expresión de cadena pesada y cadena ligera fueron cotransfectados en células COS. Dos diferentes clones de cadena pesada (H2.2 & H3.2) fueron independientemente cotransfectados con tres clones de cadena ligera quimérica diferentes (L3, L4 y L10) para confirmar la reproducibilidad del resultado. Una transfección de anticuerpo quimérico 21.6 fue llevada a cabo como control positivo para los vectores. La media condicionada se recolectó 48 horas luego de la transfección y se examinó mediante el análisis de coágulos western para la producción de anticuerpos o el ELISA para la unión Aβ.

Los múltiples transfectantes todos expresaron combinaciones de cadena pesada mas cadena ligera que fueron reconocidas como anticuerpo anti-humano IgG (H+L) sobre un examen de coagulación western.

La unión directa de los anticuerpos 3D6 y el quimérico 3D6 (PK1614) al Aβ fue examinada mediante el análisis ELISA. Se encontró que el 3D6 quimérico se une al Aβ con gran avidez, similar a la demostrada por 3D6 (Figura 3A). Además un ensayo de inhibición competitiva ELISA reveló que los anticuerpos 3D6 quimérico y el 3D6 murina competían igualmente con la unión del biotinilado 3D6 hacia el Aβ (Figura 3B). El anticuerpo quimérico demostró propiedades

3B). El anticuerpo quimérico demostró propiedades de unión indistinguibles a partir de la muestra de referencia 3D6.

Tabla 11.

Conc (µg/ml)	3D6	PK1614	IgG1
0.037		119.3	
0.11	118.6	118.9	
0.33	99.7	71.25	
1	98.63	84.53	134.4

Mas aún, tanto el 3D6 como el PK1614 fueron efectivos en la limpieza de las placas Aβ. El ensayo ex vivo demuestra que a medida que la concentración de anticuerpo aumenta la cantidad de Aβ disminuye de manera similar tanto para los anticuerpos 3D6 murina y quiméricos. De aquí que se puede concluir que las secuencias codifican cadenas funcionales 3D6 pesada y ligera respectivamente.

Ejemplo VII: Humanización del 3D6

Modelación Homología/Molecular. Con el fin de identificar los residuos de cuadro estructurales clave en el anticuerpo 3D6 de murina, se generó un modelo tridimensional basado en los anticuerpos mas cercanos de murina para las cadenas pesada y ligera. Para este propósito, un anticuerpo denominado 1CR9 fue escogido como una plantilla para modelar la cadena ligera 3D6 (PDB ID:1CR9, Kanyo et al., arriba), y un anticuerpo denominado 1OPG fue escogido como la plantilla para modelar la cadena pesada (PDB ID:1OPG Kodandapani et al., arriba). (Ver también Tabla 1) La secuencia de alineamiento de aminoácidos del 3D6 con las cadenas ligera y pesada de estos anticuerpos reveló que con la excepción del CDR3 de la cadena pesada, los anticuerpos 1CR9 y 1OPG comparten una homología de secuencia significativa con el 3D6. Además, los lazos CDR de los anticuerpos seleccionados cayeron dentro de las mismas clases estructurales canónicas Chotia como lo hacen los lazos CDR del 3D6, nuevamente con la excepción de la CDR3 de la cadena pesada. Por lo tanto, 1CR9 y 1OPG fueron inicialmente seleccionados como anticuerpos de estructura seleccionada para la moderación de homología del 3D6.

Un modelo homólogo de primer paso de la región variable 3D6 basada en los anticuerpos anotados arriba fue construido usando el software Look & SegMod Modules GeneMIne

(v3.5). Este software fue adquirido mediante una licencia perpetua del Molecular Applications Group (Palo Alto, CA). Este software creado por los Drs. Michael Levitt y Chris Lee, facilita el proceso de la moderación molecular mediante la automatización de los pasos que involucra la modelación estructural de una secuencia primaria sobre una plantilla de una estructura conocida basado en una secuencia de homología. Trabajando en una estación IRIS Silicon Graphics bajo un entorno UNIX, la estructura o modelada es automáticamente refinada por una serie de pasos de minimización de energía para liberar los contactos atómicos desfavorables y optimizar las interacciones electrostáticas van der Walls.

Un modelo mas refinado fue construido usando la capacidad de modelaje de Quanta®. Una consulta de la base de datos PDB con CDR de la cadena pesada del 3D6 identificó 1 qkz como el mas homólogo y que tuvo un número idéntico de residuos como el 3D6. De aquí que el CDR3 de la cadena pesada del 3D6 fue modelado usando la estructura cristalina del 1qkz como plantilla. Las trazas de núcleo de α-carbono del modelo 3D6 se muestran en la Figura 4. El dominio VH se muestra línea punteada y el dominio VL se muestra línea sólida, y los lazos CDR se indican en forma de lazos.

Selección de las Secuencias Anticuerpo del Humano Receptor. Secuencias anticuerpo del humano receptor adecuadas fueron identificadas mediante comparaciones de computadora de las secuencias de aminoácido de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se llevó a cabo separadamente para las cadenas ligera y pesada 3D6. En particular, dominios variables de los anticuerpos humanos cuyas secuencias de cuadro exhibieron un alto grado de identidad de secuencia con las regiones de cuadro VL y Vh de la murina fueron identificados para una consulta de la base de datos Rabat usando NCBI BLAST (accesible a través del servidor internet del National Institutes of Health NCBI) con las secuencias de cuadro de murina respectivas.

Dos secuencias candidatas fueron escogidas como secuencia de receptor basadas en los siguientes criterios: (1) homología con la secuencia del sujeto; (2) compartir estructuras canónicas CDR con la secuencia del donante; y (3) no contener ningún residuo de aminoácido raro en las regiones de cuadro. La secuencia de receptor seleccionada para VL es el número de identificación Rabat (KABAT) 019230 (Genbank Accesión No. S40342), y para el VH es KABAT 045919 (Genbank Accesión No. AF115110). Las primeras versiones del anticuerpo humanizado 3D6 utilizan esta secuencia de anticuerpo del receptor seleccionadas.

Substitución de los Residuos de Aminoácido. Como se anota mas arriba, los anticuerpos humanizados de la invención comprenden regiones de cuadro variable sustancialmente de la inmunoglobulina humana (la inmunoglobulina del receptor) y regiones de determinación de complementariedad sustancialmente de la inmunoglobulina de un ratón (inmunoglobulina del donante) denominadas 3D6. Habiendo identificado las regiones de determinación de complementariedad de 3D6 y las inmunoglobulinas de receptor humana apropiadas, el siguiente paso fue determinar cual si alguna, de estos residuos de estos componentes sustituiríamos para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. Los criterios escritos mas arriba fueron usados para seleccionar residuos para su sustitución.

Las figuras 1 y 2 muestran alineamientos del VL y VH de 3D6 de murina original, respectivamente, con la respectiva versión 1 de la secuencia humanizada, la correspondiente secuencia de cuadro del receptor humano y por último la secuencia de región V línea de germinación, mostrando la mayor homología a la secuencia de cuadro del receptor humano. Los sombreados indican los aminoácidos canónicos (relleno sólido), vernier (línea punteada), empaque (negritas) y raros (negritas cursivas), y se indican en la figura. Los asteriscos indican residuos mutados hacia los residuos de murina en la secuencia de cuadro del receptor humano, y las regiones CDR se muestran subrayadas. Un resumen de los cambios incorporados en la versión 1 de los VH y VL 3D6 humanizado se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen de cambios en 3D6.v1 humanizado

Changes	VL (112 residues)	VH (119 residues)
Hu->Mu: Framework	4/112	3/119 (1 canon, 1 packing)
CDR1	6/16	3/5
CDR2	4/7	7/14
CDR3	5/8	4/10
Hu->Mu	19/112 (17%)	17/119 (14%)
Mu->Hu: Framework	13/112	14/119
Backmutation notes	1. I2V which is a canonical position. 2. Y36L which is a packing residue and also lies under the CDRs	4. S49A Vernier/beneath the CDRs. 5. A93V which is a packing and vernier zone residue

	3. L46R which is a packing residue and lies beneath the CDRs	6. K94R which is a canonical residue
Acceptor notes	7. KABID 019230/Genbank Acc#S40342 8. Hu κ LC subgroup II 9. CDRs from same canonical structural group as donor (m3D6) L1=class 4 L2=class 1 L3=class1 10. Unknown specificity	11. KABID045919/Genbank Acc#AF115110 12. Hu HC subgroup III 13. CDRs from same canonical structural group as donor (m3D6) H1=class 1 H2=class3 14. Recognizes capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis
Acceptor Germline	15. VH3-23	16. A3 & A19

Las Tablas 13 y 14 presentan las claves de numeración Rabat para las diversas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Tabla 13: Clave de la numeración Kabat para la cadena ligera.

KAB #	#	TYPE	mouse 3D6 VL	HUM 3D6VL	KABID 019230	A19-Germ-line	Comment
1	1	FR1	Y	Y	D	D	Rare mouse, may contact CDR
2	2		V	V	I	I	Canonical/CDR contact
3	3		V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	
5	5		T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	
7	7		T	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	
10	10		T	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	
12	12		S	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	
14	14		T	T	T	T	
15	15		I	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	
17	17		Q	E	E	E	
18	18		P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	
23	23		C	C	C	C	

24	24	CDR1	K	K	R	R	
25	25		S	S	S	S	
26	26		S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	
27B	29		L	L	L	L	
27C	30		L	L	L	L	
27D	31		D	D	H	H	
27E	32		S	S	S	S	
28	33		D	D	N	N	
29	34		G	G	G	G	
30	35		K	K	Y	Y	
31	36		T	T	N	N	
32	37		Y	Y	Y	Y	
33	38		L	L	L	L	
34	39		N	N	D	D	
35	40	FR2	W	W	W	W	
36	41		L	L	Y	Y	Packing residue
37	42		L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	
39	44		R	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	
45	50		K	Q	Q	Q	
46	51		R	R	L	L	Packing residue
47	52		L	L	L	L	
48	53		I	I	I	I	
49	54		Y	Y	Y	Y	
50	55	CDR2	L	L	L	L	
51	56		V	V	G	G	
52	57		S	S	S	S	
53	58		K	K	N	N	
54	59		L	L	R	R	
55	60		D	D	A	A	
56	61		S	S	S	S	

57	62	FR3	G	G	G	G
58	63		V	V	V	V
59	64		P	P	P	P
60	65		D	D	D	D
61	66		R	R	R	R
62	67		F	F	F	F
63	68		T	S	S	S
64	69		G	G	G	G
65	70		S	S	S	S
66	71		G	G	G	G
67	72		S	S	S	S
68	73		G	G	G	G
69	74		T	T	T	T
70	75		D	D	D	D
71	76		F	F	F	F
72	77		T	T	T	T
73	78		L	L	L	L
74	79		K	K	K	K
75	80		I	I	I	I
76	81		S	S	S	S
77	82		R	R	R	R
78	83		I	V	V	V
79	84		E	E	E	E
80	85		A	A	A	A
81	86		E	E	E	E
82	87		D	D	D	D
83	88		L	V	V	V
84	89		G	G	G	G
85	90		L	V	V	V
86	91		Y	Y	Y	Y
87	92		Y	Y	Y	Y
88	93		C	C	C	C
89	94	CDR3	W	W	M	M
90	95		Q	Q	Q	Q
91	96		G	G	A	A
92	97		T	T	L	L
93	98		H	H	Q	Q
94	99		F	F	T	T
95	100		P	P	P	P
96	101		R	R	R	
97	102		T	T	T	

98	103	FR4	F	F	F
99	104		G	G	G
100	105		G	Q	Q
101	106		G	G	G
102	107		T	T	T
103	108		K	K	K
104	109		L	V	V
105	110		E	E	E
106	111		I	I	I
106A	112		K	K	K

Tabla 14. Clave de la numeración Kabat para la cadena pesada.

KAB #	#	TYPE	Mouse 3D6 VH	HUM 3D6 VH	KABID 045919	VH3-23 Germ-line	Comment
1	1	FR1	E	E	E	E	
2	2		V	V	V	V	
3	3		K	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L	L	
5	5		V	L	L	L	
6	6		E	E	E	E	
7	7		S	S	S	S	
8	8		G	G	G	G	
9	9		G	G	G	G	
10	10		G	G	G	G	
11	11		L	L	L	L	
12	12		V	V	V	V	
13	13		K	Q	Q	Q	
14	14		P	P	P	P	
15	15		G	G	G	G	
16	16		A	G	G	G	
17	17		S	S	S	S	
18	18		L	L	L	L	
19	19		K	R	R	R	
20	20		L	L	L	L	
21	21		S	S	S	S	
22	22		C	C	C	C	
23	23		A	A	A	A	
24	24		A	A	A	A	
25	25		S	S	S	S	
26	26		G	G	G	G	
27	27		F	F	F	F	
28	28		T	T	T	T	
29	29		F	F	F	F	
30—	30		S	S	S	S	
31	31	CDR1	N	N	S	S	
32	32		Y	Y	Y	Y	
33	33		G	G	A	A	
34	34		M	M	V	M	
35	35		S	S	S	S	

36	36	FR2	W	W	W	W	
37	37		V	V	V	V	
38	38		R	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q	Q	
40	40		N	A	A	A	Rare mouse, replace w/Hum
41	41		S	P	P	P	
42	42		D	G	G	G	Rare mouse, replace w/Hum
43	43		K	K	K	K	
44	44		R	G	G	G	
45	45		L	L	L	L	
46	46		E	E	E	E	
47	47		W	W	W	W	
48	48		V	V	V	V	
49	49		A	A	S	S	CDR contact/veneer
50	50	CDR2	S	S	A	A	
51	51		I	I	I	I	
52	52		R	R	S	S	
52A	53		S	S	G	G	
53	54		G	G	S	S	
54	55		G	G	G	G	
55	56		G	G	G	G	
56	57		R	R	S	S	
57	58		T	T	T	T	
58	59		Y	Y	Y	Y	
59	60		Y	Y	Y	Y	
60	61		S	S	A	A	
61	62		D	D	D	D	
62	63		N	N	S	S	
63	64		V	V	V	V	
64	65		K	K	K	K	
65	66		G	G	G	G	

66	67	FR3	R	R	R	R	
67	68		F	F	F	F	
68	69		T	T	T	T	
69	70		I	I	I	I	
70	71		S	S	S	S	
71	72		R	R	R	R	
72	73		E	D	D	D	
73	74		N	N	N	N	
74	75		A	A	A	S	
75	76		K	K	K	K	
76	77		N	N	N	N	
77	78		T	S	S	T	
78	79		L	L	L	L	
79	80		Y	Y	Y	Y	
80	81		L	L	L	L	
81	82		Q	Q	Q	Q	
82	83		M	M	M	M	
82A	84		S	N	N	N	
82B	85		S	S	S	S	
82C	86		L	L	L	L	
83	87		K	R	R	R	
84	88		S	A	A	A	
85	89		E	E	E	E	
86	90		D	D	D	D	
87	91		T	T	T	T	
88	92		A	A	A	A	
89	93		L	L	L	V	
90	94		Y	Y	Y	Y	
91	95		Y	Y	Y	Y	
92	96		C	C	C	C	
93	97		V	V	A	A	Packing residue, use mouse
94	98		R	R	K	K	Canonical, use mouse

95	99	CDR3	Y	Y	D
96	100		D	D	N
97	101		H	H	Y
98	102		Y	Y	D
99	103		S	S	F
100	104		G	G	W
100A	105		S	S	S
100B	106		S	S	G
100C	107		-	-	T
100D	108		-	-	F
101	109		D	D	D
102	110		Y	Y	Y
103	111	FR4	W	W	W
104	112		G	G	G
105	113		Q	Q	Q
106	114		G	G	G
107	115		T	T	T
108	116		T	L	L
109	117		V	V	V
110	118		T	T	T
111	119		V	V	V
112	120		S	S	S
113	121		S	S	S

Los anticuerpos humanizados de preferencia exhiben una afinidad de unión específica para el Aβ de al menos 10^7, 10^8, 10^9 o 10^{10} M^{-1}. En general el límite superior para la afinidad de unión de los anticuerpo humanizados para el Aβ esta dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquella del 3D6 (es decir, aproximadamente ~10^9 M^{-1}). A menudo el límite inferior de la afinidad de unión también esta dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquella del 3D6.

Ensamblaje y Expresión de VH y VL Humanizado 3D6, Versión 1. Brevemente, para cada región V, se sintetizó 4 oligonucleótidos traslapados simples y grandes. Además, se sintetizó 4 imprimantes PCR para cada región V para facilitar aún mas el ensamblaje de la región particular V. Las secuencias ADN de los oligonucleótidos empleados para este propósito se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Oligonucleotidos del ADN

DNA#	SIZE	Coding?	Sequence	comments
4060	136	Yes	tccgc aagct tgccg ccacc ATGGA CATGC GCGTG CCCGC CCAGC TGCTG GGCCT GCTGA TGCTG TGGGT GTCCG GCTCC TCCGG CTACG TGGTG ATGAC CCAGT CCCCC CTGTC CCTGC CCGTG ACCCC CGGCG A (SEQ ID NO:17)	hum 3D6 VL-A
4061	131	No	CTGGG GGGAC TGGCC GGGCT TCTGC AGCAG CCAGT TCAGG TAGGT CTTGC CGTCG GAGTC CAGCA GGGAC TGGGA GGACT TGCAG GAGAT GGAGG CGGGC TCGCC GGGGG TCACG GGCAG GGACA GGGGG G (SEQ ID NO:18)	hum 3D6 VL-B
4062	146	Yes	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AAGCC CGGCC AGTCC CCCCA GCGCC TGATC TACCT GGTGT CCAAG CTGGA CTCCG GCGTG CCCGA CCGCT TCTCC GGCTC CGGCT CCGGC ACCGA CTTCA CCCTG AAGAT CTCCC GCGTG GAGGC C (SEQ ID NO:19)	hum 3D6 VL-C
4063	142	No	aattc tagga tccac tcacg CTTGA TCTCC ACCTT GGTGC CCTGG CCGAA GGTGC GGGGG AAGTG GGTGC CCTGC CAGCA GTAGT ACACG CCCAC GTCCT CGGCC TCCAC GCGGG AGATC TTCAG GGTGA AGTCG GTGCC GG (SEQ ID NO:20)	hum 3D6 VL-D
4064	16	No	CTGGG GGGAC TGGCC G (SEQ ID NO: 21)	hum 3D6 VL A+B back %A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.2[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.96
4065	22	Yes	ACCTG AACTG GCTGC TGCAG AA (SEQ ID NO:22)	hum 3D6 VL C+D forward % A+T = 45.45 [10]; % C+G = 54.55 [12] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 64.54
4066	138	Yes	acaga aagct tgccg ccacc ATGGA GTTTG GGCTG AGCTG GCTTT TTCTT GTGGC TATTT TAAAA GGTGT CCAGT GTGAG GTGCA GCTGC TGGAG TCCGG CGGCG GCCTG GTGCA GCCCG	hum 3D6 VH-A

			GCGGC TCCCT GCGCC TGT (SEQ ID NO:23)	
4067	135	No	GCCGC CGGAG CGGAT GGAGG CCACC CACTC CAGGC CCTTG CCGGG GGCCT GGCGC ACCCA GGACA TGCCG TAGTT GGAGA AGGTG AAGCC GGAGG CGGCG CAGGA CAGGC GCAGG GAGCC GCCGG GCTGC ACCAG (SEQ ID NO:24)	hum 3D6 VH-B
4068	142	Yes	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT CCGCT CCGGC GGCGG CCGCA CCTAC TACTC CGACA ACGTG AAGGG CCGCT TCACC ATCTC CCGCG ACAAC GCCAA GAACT CCCTG TACCT GCAGA TGAAC TCCCT GCGCG CCGAG GACAC CG (SEQ ID NO:25)	hum 3D6 VH-C
4069	144	No	ctgca aggat ccact caccG GAGGA CACGG TCACC AGGGT GCCCT GGCCC CAGTA GTCGG AGGAG CCGGA GTAGT GGTCG TAGCG CACGC AGTAG TACAG GGCGG TGTCC TCGGC GCGCA GGGAG TTCAT CTGCA GGTAC AGGG (SEQ ID NO:26)	hum 3D6 VH-D
4070	16	No	GCCGC CGGAG CGGAT G (SEQ ID NO:27)	hum 3D6 VH A+B back % A+T = 18.75 [3]; % C+G = 81.25[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.96
4071	20	Yes	CTGGA GTGGG TGGCC TCCAT (SEQ ID NO:28)	hum 3D6 VH C+D forward % A+T = 35.00 [7]; % C+G = 65.00 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.55
4072	19	Yes	tcc gca agc ttg ccg cca c (SEQ ID NO:29)	Hum 3D6 VL A+B Forward % A+T = 31.58 [6]; % C+G = 68.42[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.64
4073	29	No	aat tct agg atc cac tca cgC TTG ATC TC (SEQ ID NO:30)	Hum 3D6 VL C+D Back % A+T = 55.17[16]; % C+G = 44.83 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.04
4074	23	Yes	aca gaa agc ttg ccg cca ccA TG (SEQ ID NO:31)	Hum 3D6 VH A+B Forward % A+T = 43.48 [10];

				% C+G = 56.52 [13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.33
4075	22	No	ctg caa gga tcc act cac cGG A (SEQ ID NO:32)	Hum 3D6 VH C+D Back % A+T = 40.91 [9]; % C+G = 59.09[13] Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 66.40

La cadena humanizada fue ensamblada usando PCR. El análisis de la secuencia ADN de mas de dos docenas de clones reveló mutaciones de punto aislado y eliminaciones a través de la región VL respecto a la secuencia esperada. El análisis de la secuencia indicó que el clon 2.3 podía usarse para reparación de 2 eliminaciones de un solo nucletoide cercanamente espaciadas en la región terminal amino. De aquí que la mutagénesis dirigida se llevó a cabo sobre el clon pCRShum3D6v12.3 usando oligonucleótidos para introducir los dos nucleótidos eliminados, y la reparación de las mutaciones de punto fue confirmada mediante un análisis de secuencia ADN, y el inserto VL fue clonado dentro del vector de expresión de la cadena ligera pCMV-cK.

El ensamblaje de VH humanizado usando métodos basados en PCR resultó en clones con grandes eliminaciones en la mitad 5' de la secuencia. Mayores esfuerzos para optimizar las condiciones de PCR lograron un éxito parcial. Los clones ensamblados por medio de las condiciones optimizadas PCR aún tenían de 10-20 nt eliminaciones en la región mapeada hacia el traslape de los fragmentos A+B. En consecuencia, se empleó una estrategia alternativa para el ensamblaje VH utilizando una extensión de traslape mediada por polimerasa ADN (T4, Klenow, y Sequenase), seguida por una ligasa ADN T4 para unir covalentemente los terminales traslapantes. El análisis de secuencia ADN de un subconjunto de los clones que resultaron del ensamblaje VH usando esta última técnica reveló mutaciones de punto aislado y eliminaciones entre los clones. El análisis de mas de dos docenas de clones reveló esencialmente el mismo patrón como se ilustra para los clones. Los resultados similares que se observaron después del primer paso de ensamblaje de los clones VH y VL sugieren que los errores de secuencia ADN observados resultaron a partir de errores automatizados del sintetizador durante la síntesis de los ADNs largos empleados para el ensamblaje.

Se seleccionó el clon VH 2.7 humanizado para la reparación mediada SDM de las 3 eliminaciones nucletoides que se observó que contenía.

Ejemplo VIII: Caracterización del Anticuerpo Humanizado 3D6v2

Se creó una segunda versión de 3D6 humanizado teniendo cada una de las sustituciones indicadas para la versión 1, excepto por la sustitución D→Y en el residuo 1. La sustitución de este residuo fue realizada en la versión 1 debido a que el residuo fue identificado como un residuo que interactuaba con CDR. Sin embargo la sustitución eliminó un residuo que era raro para las inmunoglobulinas humanas en esa posición. De aquí que una versión fue creada sin hacer la sustitución. Mas aún, los residuos no línea de germinación en las regiones de cuadro de la cadena pesada fueron sustituidos con residuos de línea de germinación, específicamente H74 = S, H77 = T y H89 = V. La numeración Kabat para las cadenas ligera y pesada versión 2, es la misma que se muestra en las Tablas 13 y 14 respectivamente, excepto que el residuo 1 de la cadena ligera de la versión 2 es ASP (D), el residuo 74 de la cadena pesada es ser (S), el residuo 77 de la cadena pesada es thr (T) y el residuo 89 de la cadena pesada es val (V). Las secuencias nucleótidas de 3D6 humanizado, versiones 1 y 2 se presentan como SEQ ID Nos: 33 y 34 respectivamente.

Ejemplo IX: Examen Funcional de los Anticuerpos Humanizados 3D6

La unión del 3D6v1 humanizado al Aβ agregado. Un examen funcional de la 3D6v1 humanizada se llevó a cabo usando media condicionada a partir de células pasajeras COS transfectadas. Las células fueron transfectadas con anticuerpo quimérico totalmente, una mezcla de cadena pesada quimérica y cadena ligera humanizada o cadena ligera quimérica y cadena pesada humanizada y por último anticuerpo totalmente humanizado. La media condicionada fue probada en su capacidad de unión al agregado Aβ1-42 mediante el ensayo ELISA. El anticuerpo humanizado demostró buena actividad dentro de un error experimental y mostró propiedades de unión indistinguibles con relación a la muestra de referencia quimérica 3D6. Los resultados es muestran en la Tabla 16.

Tabla 16:

ng/ml	Chimeric	hu VH/ ChVL	ChVH/ HuVL	Hu VH/ HuVL
690			0.867	
600				0.895
260	0.83			
230			0.774	
200				0.81
190		0.811		
87	0.675			
77			0.594	
67				0.689
63		0.648		
29	0.45			
25			0.381	
22				0.496
21		0.438		
9.6	0.251			
8.5			0.198	
7.4				0.278
7		0.232		
3.2	0.129			
2.3		0.124		

Para comparar las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados 3D6v1 y 3D6v2, se llevó a cabo un análisis ELISA usando Aβ agregado como antígeno. Los resultados muestran que tanto el 3D6v1 (H1L1) y el 3D6v2 (H2L2) tienen casi idénticas propiedades de unión al Aβ (Figura 5).

Análisis de Reemplazo NET (rNET) del h3D6v2. El ensayo de mapa epítope rNET provee información con respecto a la contribución de los residuos individuales dentro del epítope a la actividad de unión global del anticuerpo. El análisis rNET utiliza péptidos análogos sintetizados sistemáticos de una sola sustitución. La unión de un anticuerpo bajo examen se determina contra el péptido nativo (antígeno nativo) y contra 19 péptidos de "una sola sustitución" como alternativa, estando cada péptido sustituido en la primera posición con uno de 19 aminoácidos no nativos para esa posición. Se genera un perfil reflejando el efecto de la sustitución en dicha posición con los diversos residuos no nativos. El perfil combinado o mapa de epítope, (reflejando la sustitución en cada posición con todos los 19 residuos no nativos) puede luego ser comparado a un mapa generado de manera similar para un segundo anticuerpo. Mapas sustancialmente similares o idénticos indican que los anticuerpos

que se están comparando tienen la misma o similar especificidad de epítope.

Este análisis se llevó a cabo para el 3D6 y el 3D6 humanizado, versión 2. Los anticuerpos fueron examinados en su capacidad de unión contra el péptivo nativo Aβ DAEFRHDSGY (SEQ ID NO:33). Los residuos 1-8 fueron sistemáticamente sustituidos con cada uno de los 19 residuos no nativos para dicha posición. Se generó en consecuencia mapas para el 3D6 y el h3D6v2. Los resultados se presentan en forma tabular en la Tabla 17.

Tabla 17: Aβ: reemplazo de Net Epitope (rNET) mapeo of wt3D6 y 3D6 numanizado

Substitution	Wildtype 3D6 [OD]	Humanized 3D6 [OD]	Substitution	Wildtype 3D6 [OD]	Humanized 3D6 [OD]
Residue 1 = A	0.464	0.643	Residue 5 = A	0.275	0.435
C	0.450	0.628	C	0.359	0.635
D	0.577	0.692	D	0.080	0.163
E	0.576	0.700	E	0.115	0.187
F	0.034	0.062	F	0.439	0.569
G	0.569	0.738	G	0.485	0.679
H	0.054	0.117	H	0.577	0.680
I	0.048	0.118	I	0.510	0.671
K	0.033	0.057	K	0.573	0.693
L	0.073	0.148	L	0.517	0.691
M	0.039	0.072	M	0.418	0.611
N	0.587	0.757	N	0.476	0.655
P	0.069	0.144	P	0.093	0.198
Q	0.441	0.689	Q	0.388	0.565
R	0.056	0.155	R	0.613	0.702
S	0.569	0.762	S	0.487	0.633
T	0.450	0.702	T	0.530	0.639
V	0.057	0.190	V	0.493	0.562
W	0.031	0.070	W	0.393	0.461
Y	0.341	0.498	Y	0.278	0.230
Residue 2 = A	0.548	0.698	Residue 6 = A	0.587	0.707
C	0.553	0.694	C	0.585	0.703
D	0.119	0.222	D	0.584	0.701
E	0.563	0.702	E	0.579	0.702
F	0.577	0.717	F	0.586	0.704
G	0.527	0.720	G	0.592	0.709
H	0.534	0.741	H	0.596	0.688
I	0.522	0.722	I	0.602	0.708
K	0.548	0.722	K	0.585	0.691
L	0.482	0.705	L	0.584	0.688
M	0.535	0.705	M	0.583	0.687
N	0.525	0.735	N	0.580	0.686
P	0.445	0.707	P	0.587	0.705
Q	0.567	0.756	Q	0.570	0.695

	R	0.562	0.719	R	0.576	0.686
	S	0.587	0.705	S	0.573	0.689
	T	0.552	0.712	T	0.573	0.700
	V	0.550	0.702	V	0.588	0.715
	W	0.553	0.701	W	0.576	0.696
	Y	0.547	0.704	Y	0.595	0.708
Residue 3 =	A	0.038	0.061	Residue 7 = A	0.580	0.688
	C	0.222	0.410	C	0.559	0.676
	D	0.019	0.027	D	0.573	0.681
	E	0.542	0.689	E	0.565	0.677
	F	0.034	0.060	F	0.546	0.668
	G	0.016	0.019	G	0.562	0.679
	H	0.016	0.020	H	0.557	0.675
	I	0.019	0.024	I	0.552	0.681
	K	0.053	0.090	K	0.565	0.685
	L	0.019	0.026	L	0.566	0.701
	M	0.019	0.027	M	0.562	0.697
	N	0.024	0.032	N	0.573	0.688
	P	0.017	0.020	P	0.582	0.678
	Q	0.153	0.406	Q	0.563	0.679
	R	0.015	0.023	R	0.551	0.677
	S	0.016	0.021	S	0.563	0.674
	T	0.015	0.019	T	0.560	0.685
	V	0.016	0.021	V	0.563	0.687
	W	0.149	0.304	W	0.547	0.685
	Y	0.016	0.020	Y	0.560	0.682
Residue 4 =	A	0.016	0.020	Residue 8 = A	0.573	0.687
	C	0.020	0.023	C	0.583	0.700
	D	0.017	0.020	D	0.586	0.697
	E	0.016	0.021	E	0.601	0.701
	F	0.557	0.703	F	0.586	0.687
	G	0.016	0.020	G	0.569	0.681
	H	0.470	0.723	H	0.559	0.683
	I	0.119	0.360	I	0.568	0.686
	K	0.015	0.018	K	0.557	0.698
	L	0.559	0.716	L	0.570	0.686
	M	0.549	0.725	M	0.571	0.693
	N	0.085	0.089	N	0.573	0.700
	P	0.030	0.056	P	0.574	0.694
	Q	0.065	0.110	Q	0.590	0.703
	R	0.016	0.019	R	0.589	0.699
	S	0.026	0.031	S	0.599	0.719
	T	0.016	0.021	T	0.586	0.689
	V	0.213	0.494	V	0.578	0.688
	W	0.291	0.568	W	0.567	0.687
	Y	0.529	0.730	Y	0.574	0.680

De manera notable, los perfiles son virtualmente idénticos para 3D6 y h3D6v2 cuando uno mida a las sustituciones en cada posición (es decir los valores fluctúan de manera idéntica cuando se compara la data en la columna 1 (3D6) contra la columna 2 (h3D6v2)). Estos datos demuestran que la especificidad de h3D6v2 es preservada, en la medida en que el mapa de epítope rNET h3D6v2 es virtualmente idéntico al m3D6 usando ambos residuos Aβ 1-4 y 5-8.

La inmunohistoquímica sobre secciones de cerebro PDAPP demuestra especificidad del anticuerpo h3D6v2. El anticuerpo humanizado 3D6v1 reconoció Aβ en secciones de cerebro criostáticas preparadas a partir de ratones PDAPP. Los 3D6v1 y el PK1614 humanizados ambos se unieron a placas PDAPP en la misma manera de respuesta, como se midió en la cantidad de fluorescencia (cuantificado en pixeles), por transparencia contra el monto de anticuerpo usado para colorear el tejido (Figura 6). Se usaron anticuerpos secundarios antihumanos idénticos en este experimento. Los procedimientos de seccionamiento coloreado e imágenes fueron previamente descritos. En experimentos idénticos, el análisis de imágenes del h3D6v2 coloreando secciones de cerebro PDAPP y AD reveló que el h3D6v2 reconoce placas Aβ de manera similar al 3D6v1 (es decir placas bastante decoradas).

Análisis de unión competitiva del h3D6. La habilidad de los anticuerpos h3D6 v1 y v2 para competir con el 3D6 de murina fue medido mediante ELISA usando un anticuerpo 3D6 biotinilado. El análisis de unión competitiva reveló que el h3D6v1, h3D6v2 y el PK1614 quimérico pueden competir con el m3D6 para unirse al Aβ (Figura 7). El h3D6v1 y h3D6v2 fueron idénticos en su habilidad de competir con el 3D6 en relación al Aβ. El anticuerpo 10D5 fue usado como control negativo ya que tiene un epítope de unión diferente que el 3D6. El análisis BIAcore también reveló una alta afinidad del h3D6v1 y h3D6v2 para el Aβ (Tabla 18).

Tabla 18: *Medición de Afinidad* de anticuerpos Aβ usando BIAcore Technology

Antibody	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	Kd (nM)
Mu 3D6	4.06E+05	3.57E-04	0.88
Chimeric 3D6	4.58E+05	3.86E-04	0.84
Hu 3D6v1	1.85E+05	3.82E-04	2.06
Hu 3D6v2	1.70E+05	3.78E-04	2.24

En comparación al 3D6, que tiene un Kd de 0.88 nM, tanto el h3D6v1 y h3D6v2 tenían entre 2 a 3 veces menos afinidad de unión medida a 2.06 nM y 2.24 nM para el h3D6v1 y h3D6v2, respectivamente. El ensayo de unión competitiva ELISA reveló una afinidad de unión aproximadamente 6 veces menor para el h3D6v1 y h3D6v2. Típicamente los anticuerpos humanizados pierden alrededor de 3-4 veces en afinidad de unión en comparación a sus contrapartes de murina. Por lo tanto, una pérdida de alrededor de 3 veces (el promedio de ELISA y BIAcore) para h3D6v1 y h3D6v2 se encuentra dentro del rango aceptado.

Ensayos ex vivo usando el anticuerpo h3D6v2. La habilidad del h3D6v2 para estimular las células microgliales fue examinada a través de un ensayo de fagocitosis ex vivo (Figura 8). El h3D6v2 fue tan efectivo como el 3D6 quimérico en inducir la fagocitosis de los agregados Aβ para el tejido cerebral de los ratones PDAPP. Se uso IgG como control negativo en este experimento porque éste es incapaz de unirse al Aβ y por lo tanto no puede inducir fagocitosis.

Localización en el cerebro in vivo del h3D6. h3D6v2 titulado con ^{125}I, m3D6, y anticuerpo DAE13 fueron inyectados vía intravenosa en 14 ratones individuales PDAPP en experimentos separados. Los ratones fueron sacrificados después del día 7 y remojados para los análisis posteriores. Sus regiones cerebrales fueron disecadas y medidas para la actividad del ^{125}I en regiones del cerebro específicas. La actividad radiotitulada en el cerebro fue comparada con la actividad en las muestras de suero. Los resultados se presentan en las Tablas 19 y 20 para el suero y las regiones cerebrales respectivamente.

Tabla 19

m3D6	DAE13	Hu3D6
30389.1	17463.9	40963.8
12171	13209.6	24202.2
3418.2	36284.7	12472.4
18678.9	421.3	33851.8
27241	19702	27187.3
26398.8	24855.8	29016.9
27924.8	29287.4	33830.7
12008.4	12733.1	26734.9
29487.8	27722.5	30144.5
25498.6	30460.7	35126.9
9652	23320.1	28414.8
24599.3	7119.1	16956.1

29240	28093.5	18190.7
11922.7	24659.7	25671.4
17443.1	26748.9	

Tabla 20

m3D6			DAE13			Hu3D6 (H2L2)		
cere	cort	hipp	cere	cort	hipp	cere	cort	hipp
1991.9	1201.1	4024	1277.5	2522.9	5711.9	2424.6	3759.4	11622
238.9	746.1	2523	502.5	2123.5	6965.8	1509.8	2274.9	7018.2
645.9	603	1241.1	2325	3528.2	7801.6	500	2265.9	5316.3
1000	2508.2	4644.2	232.7	849.8	1891.9	2736.2	5703.7	10395.5
1266.9	3737.9	7975.8	891.6	2621	8245.2	1192.2	3188	10170
1422	2398.7	7731.1	1102.6	2087.5	7292.3	2289.4	3481.4	9621.6
1700.4	2154.4	7124.1	1650.6	3488.4	10284.8	1526.7	3028	8331.3
542.5	812.4	2456.8	712.9	2318.5	8643.3	1538.1	4194.1	11244.8
1309	3010.5	8893.5	1172.9	1953.6	7363	1245.7	1699.4	6831.2
1372.2	997.5	2425.4	1067.9	3697.2	12280.7	2708.8	2789	7887.4
778.6	1291.9	5654.4	1952.2	2120.7	6412.7	2251.3	3897.5	11121.5
1199.3	1683.4	4887.3	1005.2	1852.5	5121.4	1529.6	1772.2	7986.9
1021.8	3234.5	8036.2	961.5	3382.9	8473.1	644.1	1663.4	5056.5
742.1	1056.7	3405.2	852.3	1943.2	6717.4	1516.4	1620.6	9888
1273.7	1320,8	4262.6	997.5	3085.7	10213.1			

La data mostró que el h3D6v2 se localizaba en el cerebro y que se encontraba particularmente concentrado en la región hipocampal donde se sabe que el Aβ se acumula. Las cuentas cerebrales para el m3D6 y el DAE13 fueron comparables a las del h3D6v2. Los tres anticuerpos estuvieron en condiciones de cruzar la barrera de sangre como lo demuestra la unión a la placa Aβ in vivo.

Ejemplo X: Clonación y Secuenciación de las Regiones Variables de Ratón 10D5.

Análisis de Clonación y Secuencia del 10D5 VH. Las regiones VH y VL del 10D5 de las células hibridomas fueron clonadas mediante RT-PCR usando procedimientos 5' RACE. La secuencia nucleotida (SEQ ID NO:13) y la secuencia de aminoácido deducida (SEQ ID NO:14) derivada de dos clones independientes cADN codificando el dominio presumible 10D5 VL se presentan en la Tabla 21 y Figura 9. La secuencia nucleotida (SEQ ID NO:15) y la secuencia de aminoácido deducida (SEQ ID NO:16) derivada de dos clones independientes cADN codificando el dominio 10D5 VH presumible, se presentan en la Tabla 22 y la Figura 10. Las secuencias 1-D5 VL y VH cumplieron con los criterios para las regiones funcionales V en tanto ellas contenían ORF contigua desde la meteo-

nina del iniciador a la región C, y compartían residuos característicos conservados de los genes de la inmunoglobulina de la región V.

Tabla 21: Secuencia de ADN 10D5 VL de ratón

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTACTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGA
TGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACATTATACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG
TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATT
TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGA
TCAAGAAAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTT
CCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGGAA (SEQ ID NO:13)

*Se subraya el péptido directriz

Tabla 22: Secuencia de ADN 10D5 VH de ratón

ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCCTGTCCCA
GGCTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGAATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA
CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGAGTGAGCTGGATTCGT
CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCG
CTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAAGCAGG
TATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACCCTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGTTCGA
AGGCCCATTACTCCGGTACTAGTCGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:15)

*Se subraya el péptido directriz

Ejemplo XI: Prevención y Tratamiento de Sujetos Humanos

Un examen de fase simple I se lleva acabo para determinar la seguridad en humanos. Un agente terapéutico se administra en dosificaciones que van incrementando a diferentes pacientes empezando desde alrededor de 0.01 el nivel de eficacia presumida, e incrementándose por un factor de tres hasta que el nivel es alrededor de 10 veces la dosis efectiva de los ratones son alcanzados.

Un examen de fase II se lleva a cabo para determinar la eficacia terapéutica. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer temprana a mediana definidos usando los criterios de la Asociación de Desorden Relacionados y la enfermedad de Alzheimer para el probable AD son seleccionados. Los pacientes adecuados logran un puntaje de 12-26 en el Examen de Estado Mini-Mental (MMSE). Otro criterio de selección es que los pacientes probablemente sobrevivan la duración del estudio y no tengan problemas que compliquen tales como el uso de medicaciones concomitantes que pudieran interferir. Las evaluaciones de línea base de las funciones del pacien-

te se hacen usando mediciones sicométricas clásicas, tales como la MMSE, y la ADAS, que es una escala completa para evaluar pacientes con estados de enfermedad de Alzheimer y sus funciones. Estas escalas sicométricas brindan una medida del progreso de la condición de Alzheimer. Escalas vivas cualitativas adecuadas también pueden ser utilizadas para monitorear el tratamiento. El progreso de la enfermedad también se puede monitorear mediante la MRI. Los perfiles de sangre de los pacientes también pueden ser monitoreados incluyendo ensayos de anticuerpos específicos inmunógenos y de la respuesta de las celdas T.

Siguiendo las mediciones de base de línea, los pacientes empiezan a recibir tratamiento, al azar son tratados con agente terapéutico o placebo de tal manera que no lo sepan. Los pacientes son monitoreados al menos seis meses. La eficacia se determina mediante una reducción significativa en la progresión de un grupo de tratamiento con relación al grupo de placebo.

Un examen de segunda fase II se lleva a cabo para evaluar la conversión de pacientes de la pérdida de memoria temprana que no son ocasionados por la enfermedad de Alzheimer, a los que a veces denominamos como defectos de memoria asociados a la edad (AAMI) o dificultades cognitivas medianas (MCI), a la probable enfermedad de Alzheimer como se define según el criterio de ADRDA. Los pacientes con alto riesgo para la conversión a la enfermedad de Alzheimer se seleccionan de una población no clínica por medio de la filtración de poblaciones de referencia con signos tempranos de pérdida de la memoria u otras dificultades asociados con la sintomatología pre-Alzheimer, un historial familiar de la enfermedad de Alzheimer, factores de riesgo genético, la edad, el sexo, y otras características que se sabe predicen un alto riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Los puntajes de base de línea en medidas adecuadas incluyen el MMS y el ADAS junto con otras métricas diseñadas para evaluar una población mas normal que son recolectadas. Estas poblaciones de pacientes son divididas en grupos adecuados en comparación al placebo contra las dosis alternativas con el agente. Estas poblaciones de pacientes son seguidas en intervalos de alrededor de seis meses, y el punto final de cada paciente es si él o ella se convierte o no a la enfermedad de Alzheimer como lo define los criterios de la ADRDA al final de la observación.

Materiales y Métodos en General

A. Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales Aβ

El anticuerpo policlonal anti- Aβ fue preparado a partir de sangre recolectada de dos grupos de animales. El primer grupo consistió en 100 ratas Swiss Webster, de 6 a 8 semanas de edad. Ellas fueron inmunizadas en los días 0, 15 y 29 con 100 µg de AN1792 combinado con CFA/IFA. Una cuarta inyección fue aplicada el día 36 con la mitad de la dosis de AN1792. Los animales fueron desangrados luego de su sacrificio el día 42, se preparo suero y este suero fue unido para crear un total de 64 ml. El segundo grupo consistió de 24 ratas isogénicas con el ratón PDAPP pero no transgénicos para el gene humano APP, de 6 a 9 semanas de edad. Ellas fueron inmunizadas en los días 0, 14, 28 y 56 con 100 µg de AN1792 combinada con CFA/IFA. Estos animales también fueron desangrados luego de su sacrificio el día 63, se preparó suero y se junto para lograr un total de 14 ml. Los dos lotes de suero fueron unidos. La fracción de anticuerpo fue purificada usando dos rondas secuenciales de precipitación con sulfato de amonio saturado al 50%. El precipitado final fue dializado contra el PBS y examinado para buscar endotóxinas. El nivel de endotóxinas fue menor a 1 EU/mg.

Los anticuerpos monoclonales anti-Aβ fueron preparados a partir de fluido ascita. El fluido fue en primer lugar deslipidado mediante la adición de sulfato de dextráno de sodio concentrado al fluido de ascito helado mediante la agitación sobre hielo hasta alcanzar una concentración final de 0.238%. Se añadió entonces $CaCl_2$ mientras se agitaba para lograr una concentración final de 64mM. Esta solución fue centrifugada a 10,000 x g y las pelotitas fueron descartadas. La nata superior fue agitada sobre hielo con igual volumen de sulfato de amonio saturado que se añadió gota a gota. La solución fue centrifugada nuevamente a 10,000 x g y la nata superior fue descartada. Las pelotitas fueron resuspendidas y dializadas contra 20mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.5. Esta fracción fue aplicada a una Columna Q Sefarosa FPLC de Farmacia y diluida con un gradiente reverso de 0.4 M a 0.275 M NaCl en 20 mM Tris-HCl, pH 7.5.

El pico del anticuerpo fue identificado mediante la absorción a 280 nm y se juntaron las fracciones apropiadas. La preparación de anticuerpo purificada fue caracterizada mediante la medición de la concentración de proteína usando el método BCA y la pureza usando SDS-PAGE. El conjunto también fue analizado para buscar endotóxinas. El nivel de endotóxinas fue menor a 1 EU/mg manchas, manchas menores de 100 que fueron arbitrariamente asignadas un valor titulado de 25.

B. Medición de los Títulos del Anticuerpo

Se desangró a los ratones mediante un pequeño corte en la vena de la cola y se recolectó alrededor de 200 µl de sangre en un tubo microfugo. Se desangraron cuyes afeitando primero el área posterior y luego usando una aguja de número 18 para perforar la vena metatarsal y recolectar la sangre en tubos microfugos. Se dejó coagular la sangre por una hora a temperatura ambiente (RT), se le hizo un movimiento de remolino, y luego se centrifugó a 14,000 x g por 10 minutos para separa el coagulo del suero. El suero fue entonces transferido a un tubo microfugo limpio y almacenado a 4°C hasta que se tituló.

Los títulos anticuerpos fueron medidos mediante ELISA. SE recubrió placas microtituladoras de 96 pozos (Costar EIA) con 100 µl de una solución que contenía entre 10µl/ml de ya sea Aβ42 o SAPP u otros antígenos como se anotó en cada reporte individual en el Well Coating Buffer (0.1 M fosfato de sodio, pH 8.5, 0.1% azida de sodio) y mantenido toda la anoche a temperatura ambiente. Los pozos fueron aspirados y se agregó suero a los pozos empezando en una dilusión de 1/100 de un diluyente de muestra (0.014 M fosfato de sodio, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.6% de albumina de suero bovina, 0.05% de timerosal). Siete diluciones en serie de las muestras se hicieron directamente sobre las placas en pasos de triple acción para alcanzar una dilución final de 1/218,700. Las diluciones fueron incubadas en las pozas de la placa recubierta por una hora a temperatura ambiente. Las placas fueron entonces enjuagadas cuatro veces con PBS conteniendo 0.05% de Tween 20. El segundo anticuerpo, un cuerpo anti-ratón Ig conjugado a la peroxidasa de rabanito (obtenida de Boehringer Mannheim), fue añadido a las pozas a mediada que 100 µl de una dilución 1/3000 de diluyente de muestra fue incubado por una hora a temperatura ambiente. Las placas fueron nuevamente lavadas cuatro veces en PBS, Tween 20. Para desarrollar el cromogeno, 100 µl de TMB lento (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina obtenido de Pierce Chemicals) fue añadido a cada poza e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de 25 µl de 2 M H_2SO_4. La intensidad de color fue entonces leída sobre un Vmax Molecular Devices a (450 nm - 650 nm).

Las manchas fueron definidas como lo recíproco de la dilución del suero dando mitad del máximo de OD. El máximo OD fue generalmente tomado a partir de una dilución inicial de 1/100, excepto en los casos con muy alta coloración, en cuyo caso una dilución inicial mayor fue necesaria para establecer el máximo OD. Si el punto de 50% cayó entre dos diluciones, se hizo una extrapolación lineal para calcular

la coloración final. Para calcular la media geométrica entre coloraciones, las coloraciones de menos de 100 fueron arbitrariamente asignadas un valor de título de 25.

C. Preparación del Tejido del Cerebro

Luego de la eutanasia, los cerebros fueron retirados y un hemisferio fue preparado para el análisis inmunohistoquímico, mientras que tres regiones cerebrales (hipocampo, cortex y cerebelo), fueron disecadas del otro hemisferio y usadas para medir la concentración de diversas proteínas Aβ y formas del APP usando exámenes específicos ELISA (Johnson-Wood et al., arriba).

Los tejidos destinados para los exámenes ELISA fueron homogenizados en 10 volúmenes de apagador guanidina helado (5.0 M guanidina-HCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0). Los homogenados fueron mezclados mediante una agitación suave usando un Adams Nutator (Fisher) por tres a cuatro horas a temperatura ambiente, luego almacenados a -20ª C antes de la cuantificación de Aβ y APP. Experimentos previos habían demostrado que los productos analizados eran estables bajo estas condiciones de almacenamiento y que la proteína sintética Aβ (Bachem) podría ser cuantitativamente recuperada cuando se había insertado en homogenados de tejido de control del cerebro para ratones compañeros (Johnson-Wood et al., arriba).

D. Medición de Niveles Aβ

Los homogenizados de cerebro fueron diluidos 1:10 con diluyente Casein helado (0.25% de caseína, PBS, 0.05% de azida de sodio, 20 µg/ml de aprotinina, 5 mM EDTA pH 8.0, 10 µg/ml de leupeptina) y luego centrifugados a 16,000 x g por 20 minutos a 4ªC. Las proteínas estándar Aβ sintéticas (1-42 aminoácidos) y los estándares APP fueron preparados para incluir 0.5 M de guadinina y 0.1% de albumina de suero bovino (BSA) en la composición final. El examen de sándwich ELISA para el total de Aβ utiliza el anticuerpo monoclonal 266 especifico para los aminoácidos 13-28 de Aβ (Seubert et al., arriba), como el anticuerpo de captura, y el anticuerpo monoclonal 3D6 biotinilado, específico para el amioácido 1-5 de Aβ (Johnson-Wood et al., arriba), como el anticuerpo de reporte. El anticuerpo monoclonal 3D6 no reconoce el APP secretado o el APP de longitud completa, pero detecta solamente las especies Aβ con un aminoterminal de ácido aspártico. Este ensayo tiene un límite inferior de sensitividad de ~50 ng/ml (11nM) y muestra no tener reactividad cruzada a la proteína Aβ endógena de murina en concentraciones hasta 1 ng/ml (Johnson-Wood et al., arriba).

El sándwich ELISA específico para el Aβ1-42 emplea el mAβ 21F12, específico para los aminoácidos 33-42 de Aβ (Jonson-Wood et al., arriba), como anticuerpo de captura. El biotinilado mAβ 3D6 es también el anticuerpo de reporte en este ensayo que tiene un límite inferior de sensitividad alrededor de 125 µg/ml (28 µM, Johnson-Wood et al., arriba). Para el ELISA Aβ, se revistió 100 µl de uno de estos mAβ 266 (a 10 µg/ml) o mAβ 21F12 a (5 µg/ml) dentro de las pozas de unas placas de inmunoensayo de 96pozas (Costar) mediante la incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. La solución fue retirada pos aspiración y los pozos fueron bloqueados mediante la adición de 200 µl de albumina de suero humano al 0.25% en un apagador PBS por al menos una hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue retirada y las placas fueron almacenadas disecadas a 4°C hasta que se usaron. Las placas fueron rehidratadas con Wash Buffer [Tris apagado por solución salina (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5), mas 0.05% de Tween 20] antes de su uso. Las muestras y los estándares fueron añadidos en cuotas triplicadas de 100 µl por poza y luego incubadas por toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas al menos tres veces con Wash Buffer entre cada paso del ensayo. El mAβ 3D6 biotinilado, diluido a 0.5 µg/ml en apagador de ensayo Casein (0.25% de caseína, PBS, 0.05% de Tween 20, pH 7.4), fue añadido e incubado en las pozas por una hora a temperatura ambiente. Un conjugado de avidin en peroxidasa de rabanito, (el Avidin-HRP se obtuvo de Ector, Burlingame, CA), diluido en 1:4000 en apagador de ensayo Casein, fue añadido a las pozas por una hora a temperatura ambiente. El sustrato de colorimetría, el ELISA-TMB lento (Pierce), fue añadido y se le permitió reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual la reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 25 µl de 2 N H_2SO_4. El producto de reacción fue cuantificado usando un Vmax Molecular Devices midiendo la diferencia en absorción a 450 nm y 650 nm.

E. Medida de los Niveles APP

Dos ensayos distintos de APP se utilizaron. El primero, denominado APP-α/FL, reconoce tanto las formas APP-alfa (α) y la forma de longitud completa (FL) del APP. El segundo ensayo es específico para APP-α. El ensayo APP-α/FL reconoce el APP secretado incluyendo los primeros 12 aminoácidos de Aβ. Dado que el anticuerpo de reporte (2H3) no es específico para el punto de corte α, que ocurre entre los aminoácidos 612-613 de APP^{695} (Esch et al., Science 248:1122-1124 (1990)); este ensayo también reconoce el APP de longitud completa (APP-FL). Los experimentos prelimina-

res usando anticuerpos inmobilizados APP hacia la cola citoplasmática del APP/FL para vaciar los homogenados del cerebro de APP/FL sugieren que aproximadamente 30-40% del APP-α/FL es FL (no se muestra la data). El anticuerpo de captura para tanto el APP-α/FL y el APP-α fue mAb 8E5, elevado contra los aminoácidos 444 a 592 de la forma APP^{695} (Games et al., arriba). El mAb de reporte para el ensayo APP-α/FL es mAb 2H3, específico para aminoácidos 597-608 de APP^{695} (Johnson-Wood et al., arriba) y el anticuerpo de reporte para el ensayo APP-α es un derivado biotinilado del mAb 16H9, elevado a los aminoácidos 605 a 611 de APP. El límite inferior de sensitividad para el ensayo APPαFL es alrededor de 11 ng/ml (150 ρM) (Johnson-Wood et al.) y el del ensayo específico APP-α es de 22 ng/ml (0.3 nM). Para ambos ensayos APP, el mAb 8E5 fue revestido sobre las pozas de unas placas EIA de 96 pozas como se describe arriba para el mAb 266. Se usó APP-α recombinada secretada como el estándar de referencia para el ensayo APP-α y para el ensayo APP-α/FL (Esch et al., arriba). Las muestras de cerebro homogenadas en 5 M de guanidina fueron diluidas 1:10 en el diluyente de muestra de ELISA (0.014 M de apagador de fosfato, pH 7.4, 0.6% de albumina de suero bovino, 0.05% de timerosal, 0.5 M NaCl, 0.1% NP40). Todos estos estuvieron diluidos en relación 1:4 en el diluyente de muestra conteniendo 0.5 M de guanidina. Los homogenatos diluidos fueron entonces centrifugados a 16,000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Los estándares APP y las muestras fueron añadidas a la placa en cuotas duplicadas e incubadas por una hora y media en la temperatura ambiente. El anticuerpo de reporte bionitilado 2H3 o 16H9 fue incubado con muestras por una hora a temperatura ambiente. El fosfato alcalino de estreptavidina (Boehringer Mannheim), diluido en 1:1000 en el diluyente de muestra, fue incubado en las pozas por una hora a temperatura ambiente. El substrato fluorescente 4 metil-umbeliferil-fosfato fue añadido para una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y las placas fueron leídas en un fluorímetro Citofluor tm 2350 (Millipore), con una exitación de 365 nm y una emisión de 450 nm.

F. Inmunohistoquímica

Los cerebros fueron fijados por tres días a 40ºC en formol al 4% en PBS y luego almacenados de uno a siete días a 4ºC en formol al 1%, PBS hasta que fueran seccionados. Se cortaron secciones coronales de 40 micrones de espesor en un vibrátomo a temperatura ambiente y se almacenaron en un crioprotector (30% glicerol, 30% etilin glicol en un apagador de fosfato) a 20ºC antes del proceso inmunohistoquímico. Para cada cerebro, seis secciones al nivel del hipocam-

po dorsal cada una separada por intervalos consecutivos de 240 µm, fueron incubados durante toda la noche con uno de los siguientes anticuerpos: (1) un anti-Aβ biotinilado (mAb, 3D6, específico para el Aβ humano) diluido a una concentración de 2 µg/ml en PBS y 1% de suero de caballo; o (2) un mAb biotinilado específico parael APP humano, 8E5, diluido a una concentración de 3 µg/ml en PBS y 1% de suero de caballo; o (3) un mAb específico para la proteína acidica fibrilar glial (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluido en 1:500 con 0.25% de Triton X-100 y 1% de suero de caballo, en solución salina apagada con Tris, pH 7.4 (TBS); o (4) un mAb específico para el CD11b, antígeno MAC-1, (Chemicon International) diluido en 1:100 con 0.25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS, o (5) un mAb específico para el antígeno MHC II (Pharmingen) diluido en 1:100 con 0.25% de Triton X-100 y 1% de suero de conejo en TBS; o (6) Un mAb de rata específico para CD 43 (Pharmingen) diluido en 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (7) un mAb de rata específico para CD 45RA (Pharmingen) diluido en 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (8) un Aβ monoclonal de rata específico para CD 45RB (Pharmingen) diluido en 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (9) un Aβ monoclonal de rata específico para CD 45 (Pharmingen) diluido en 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS; o (10) un Aβ de hamster policlonal biotinilado específico para el CD3e (Pharmingen) diluido en 1:100 con 1% de suero de conejo en PBS o (11) un mAb de rata específico para CD3 (Serotec) diluido en 1:200 con 1% de suero de conejo en PBS; o (12) una solución de PBS a la cual le falta el anticuerpo primario conteniendo 1% de suero de caballo normal.

Las secciones reaccionaron con las soluciones anticuerpo listadas en 1,2 y 6-12 mas arriba y fueron pretratadas con Triton X-100 al 1%, peroxido de hidrogeno al 0.4% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Las secciones reaccionaron con 3D6 o 8E5 o CD3e mAbs y fueron entonces a una reacción por una hora a temperatura ambiente con un complejo de biotin-avidin-peroxidasa de rabanito con componentes del juego A y B diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.). Las secciones reaccionaron con anticuerpos específicos para el CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 y la solución PBS sin el anticuerpo primario y fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente con un IgG anti-rata biotinilado (Vector) diluido 1:75 en PBS o IgG anti-rata biotinilado (Vector) diluido 1:75 en PBS, respectivamente. Las secciones fueron entonces hechas reaccionar por una hora a temperatura ambiente con

un complejo biotin-avidin-peroxidasa de rabanito con componentes de los juegos A y B diluidos 1:75 en PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Se desarrollaron secciones en peróxido de hidrógeno al 0.01%, 3,3' diaminobenzidina al 0.05% (DAB) a temperatura ambiente. Las secciones destinadas para la incubación cono loa anticuerpos específicos GFAP-MAC-1-AND MHC II fueron pretratados con peróxido de hidrógeno al 0.6% a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena y luego fueron incubados toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones que reaccionaron con el anticuerpo GFAP fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente con anti-ratón IgG biotinilado hecho en caballos (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluido en 1:200 con TBS. Las secciones fueron hechas reaccionar a continuación por una hora con un complejo de biotin-avidin-peroxidasa (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluidos en 1:1000 con TBS. Las secciones incubadas con el anticuerpo monoclonal específico MAC-1- o MHC II- fueron subsecuentemente sometidos a una reacción por una hora a temperatura ambiente con anti-rata IgG biotinilado hecho en ratones diluido en 1:200 con TBS, seguido de incubación por una hora con un complejo de biotin-avidin-peroxidasa diluido en 1:1000 con TBS. Las secciones incubadas con los anticuerpos específicos GFAP-,MAC-1- y MHC II- fueron entonces visualizados para el tratamiento a temperatura ambiente con DAB al 0.05%, peróxido de hidrógeno al 0.01%, níquel cloruro al 0.04%, y TBS por 4 y 11 minutos respectivamente.

Secciones inmunotituladas fueron montadas sobre placas de vidrio (VWR, Superfrost slides), secadas al aire durante la noche, sumergidas en probar (Anatech) y cubiertas con cubreplacas usando Permount (Fisher) como el medio de montaje.

Para contracolorear las placas Aβ, un subconjunto de secciones positivas GFAP fue montado en placas Superfrost e incubadas en Thioflavin S acuoso al 1% (Sigma) por 7 minutos a continuación del proceso inmunohistoquímico. Las secciones fueron a continuación deshidratadas y limpiadas en Probar, a continuación cubiertas con cubreplacas montadas con Permount.

G. Análisis de Imágenes

Un sistema de análisis de imágenes Videometric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) unido a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una cámara de video CCD y un monitor Sony Trinitron fue usado para la cuantificación de las placas inmunoreactivas. La imagen de la sección fue almacenada en un video y el límite de saturación se determinó

para seleccionar y calcular el área total en píxeles ocupada por las estructuras inmunotituladas. Para cada sección, el hipocampo fue manualmente delineado y el área total ocupada por el hipocampo se calculó. El porcentaje de carga de amiloide fue medido como: (la fracción del área hipocampal conteniendo depósitos Aβ inmunoreactivos con mAb 3D6) x 100. De manera similar la carga porcentual neurítica fue medida como sigue: (la fracción del área hipocampal conteniendo neuritos distróficos reactivos con el anticuerpo monoclonal 8E5) x 100. El sistema de imágenes C (Compix Inc., Cranberry Township, PA) operando el programa Simple 32 Software Application fue enlazado a un microscopio Nikon Microphot-FX a través de una cámara Optronics usada para cuantificar el porcentaje de la corteza retrospinal ocupada por los astrositos GFAP positivo y la microglia positiva MAC-1- y MHC II-. La imagen de la sección inmunoreaccionada fue almacenada en un video y se determinó un límite basado en colores monocromos para seleccionar y calcular el área total en píxeles que ocupaban las células inmunotituladas. Para cada sección, la corteza retrospinal (RSC) fue manualmente delineada y el área total en píxeles ocupada por el RSC se calculó. El porcentaje de astrocitosis fue definido como: (la fracción de RSC ocupada por los astrositos reactivos GFAP) x 100. De manera similar el porcentaje de microgliosis fue definido como: (la fracción de la RSC ocupada por la microglia reactiva MAC-1- y MHC II-) x 100. Para todos los análisis de imagen, seis secciones del nivel del hipocampo dorsal cada uno separado por intervalos consecutivos de 240 µm fueron cuantificados para cada animal. En todos los casos el estado de tratamiento de los animales fue desconocido para el observador.

Aunque la invención precedente ha sido descrita en detalle para los propósitos de claridad y entendimiento, es obvio que ciertas modificaciones pueden practicarse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones y documentos de patentes que se citan aquí, así como el texto que aparece en las figuras y las listas de secuencia, se incorporan aquí como referencia en su totalidad para todos los propósitos y hasta el mismo nivel en que cada una lo denota individualmente.

De lo anterior se hace aparente que la invención se presta a un número de usos. Por ejemplo, la invención brinda la oportunidad de usar cualquiera de los anticuerpos contra el Aβ descrito en el tratamiento, la profilaxis o diagnosis de enfermedades amiloideogénicas, o en la manufactura de un medicamento o composición de diagnóstico para uso en la misma.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Basi, Guriq et al.

<120> Anticuerpos Humanizados que Reconocen el Péptido Amiloideo Beta
<130> ELN-002PE

<150> 60/251,892
<151> 2000-12-06

<160> 32

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 396
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(396)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(60)

<400> 1

```
atg atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg   48
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20                 -15                 -10                 -5

gaa acc aac ggt tat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg   96
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
                1               5                   10

gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc   144
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        15                  20                  25

ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg   192
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
    30                  35                  40

cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac   240
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45      —           50                  55                  60

tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttt   288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

aca ctg aaa atc agc aga ata gag gct gag gat ttg gga ctt tat tat   336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
            80                  85                  90

tgc tgg caa ggt aca cat ttt cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag   384
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
```

```
          95                  100                 105

ctg gaa atc aaa                                                   396
Leu Glu Ile Lys
    110
```

<210> 2
<211> 132
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(20)

<400> 2

```
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20                 -15                 -10                 -5
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
                 1               5                  10
Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        15                  20                  25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
    30                  35                  40
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45                  50                  55                  60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr
            80                  85                  90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        95                  100                 105
Leu Glu Ile Lys
    110
```

<210> 3
<211> 414
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(414)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 3

```
atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc ctt gtt tta aaa ggt   48
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
               -15                 -10                 -5

gtc cag tgt gaa gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag   96
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
            1               5                  10
```

```
cct gga gcg tct ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc   144
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
     15                  20                  25

agt aac tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag aat tca gac aag agg ctg   192
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
 30                  35                  40                  45

gag tgg gtt gca tcc att agg agt ggt ggt ggt aga acc tac tat tca   240
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                 50                  55                  60

gac aat gta aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gag aat gcc aag aac   288
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
             65                  70                  75

acc ctg tac ctg caa atg agt agt ctg aag tct gag gac acg gcc ttg   336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
         80                  85                  90

tat tat tgt gtc aga tat gat cac tat agt ggt agc tcc gac tac tgg   384
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
     95                  100                 105

ggc cag ggc acc act gtc aca gtc tcc tca                           414
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110                 115
```

<210> 4
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 4

```
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
               -15                 -10                 -5
Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
           1                   5                  10
Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
    15                  20                  25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu
30                  35                  40                  45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                50                  55                  60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn
            65                  70                  75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu
        80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
    95                  100                 105
Gly Gln Gly Thr Thr Ile Thr Val Ser Ser
110                 115
```

<210> 5
<211> 132
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(20)

<223> región variable de cadena ligera humanizada 3D6

<400> 5
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
-20 -15 -10 -5
Glu Thr Asn Gly Tyr Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
1 5 10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
15 20 25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
30 35 40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45 50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
80 85 90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
95 100 105
Val Glu Ile Lys
110

<210> 6
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 6
Met Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val
-15 -10 -5
Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala
1 5 10
Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr
15 20 25
Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu
30 35 40 45
Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
65 70 75
Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr
80 85 90
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

<210> 7
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
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> 8
<211> 138
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada Humanizada 3D6

<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 8
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
-15 -10 -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
15 20 25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30 35 40 45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
50 55 60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
80 85 90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 9

<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys

<210> 11
<211> 132
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(20)

<223> región variable de cadena ligera humanizada 3D6

<400> 11
Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg

```
-20                 -15                 -10                 -5
Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
                 1               5                  10
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
        15                  20                  25
Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys
    30                  35                  40
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
45                  50                  55                  60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
            80                  85                  90
Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
        95                  100                 105
Val Glu Ile Lys
    110
```

<210> 12
<211> 138
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región variable de cadena ligera humanizada 3D6

<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 12

```
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
                -15                 -10                 -5
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
             1               5                  10
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
    15                  20                  25
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
30                  35                  40                  45
Glu Trp Val Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser
                50                  55                  60
Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
            65                  70                  75
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
        80                  85                  90
Tyr Tyr Cys Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp
    95                  100                 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110                 115
```

<210> 13
<211> 393
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS

<222> (1)...(393)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 13
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gta ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag aac att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile
15 20 25

ata cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

ctc aag atc aag aaa gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
80 85 90

ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
95 100 105

gag ctg gaa 393
Glu Leu Glu
110

<210> 14
<211> 131
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 14
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile

```
    15                  20                  25
Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30                  35                  40                  45
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
                50                  55                  60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
            65                  70                  75
Leu Lys Ile Lys Lys Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
        80                  85                  90
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
    95                  100                 105
Glu Leu Glu
110
```

<210> 15
<211> 426
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(426)

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 15

```
atg gac agg ctt act tcc tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat   48
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
                -15                 -10                 -5

gtc ctg tcc cag gct act ctg aaa gag tct ggc cct gga ata ttg cag   96
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
            1               5                   10

tcc tcc cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg   144
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
     15                  20                  25

agc act tct ggt atg gga gtg agc tgg att cgt cag cct tca gga aag   192
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 30                  35                  40                  45

ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tac tgg gat gat gac aag cgc tat   240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
                50                  55                  60

aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga   288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
            65                  70                  75

aag cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac cct gca gat act gcc   336
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
        80                  85                  90

aca tac tac tgt gtt cga agg ccc att act ccg gta cta gtc gat gct   384
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
```

95 100 105

atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 426
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 16
<211> 142
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)...(19)

<400> 16
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
-15 -10 -5
Val Leu Ser Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
1 5 10
Ser Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
15 20 25
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
30 35 40 45
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
50 55 60
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
65 70 75
Lys Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Pro Ala Asp Thr Ala
80 85 90
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Arg Pro Ile Thr Pro Val Leu Val Asp Ala
95 100 105
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 17
<211> 136
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 17
tccgcaagct tgccgccacc atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga 60
tgctgtgggt gtccggctcc tccggctacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc 120
ccgtgacccc cggcga 136

<210> 18
<211> 131
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 18
ctgggggggac tggccgggct tctgcagcag ccagttcagg taggtcttgc cgtcggagtc 60
cagcagggac tgggaggact tgcaggagat ggaggcgggc tcgccggggg tcacgggcag 120
ggacaggggg g 131

<210> 19
<211> 146
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 19
acctgaactg gctgctgcag aagcccggcc agtcccccca gcgcctgatc tacctggtgt 60
ccaagctgga ctccggcgtg cccgaccgct tctccggctc cggctccggc accgacttca 120
ccctgaagat ctcccgcgtg gaggcc 146

<210> 20
<211> 142
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 20
aattctagga tccactcacg cttgatctcc accttggtgc cctggccgaa ggtgcggggg 60
aagtgggtgc cctgccagca gtagtacacg cccacgtcct cggcctccac gcgggagatc 120
ttcagggtga agtcggtgcc gg 142

<210> 21
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 21
ctgggggggac tggccg 16

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
<<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 22
acctgaactg gctgctgcag aa 22

<210> 23
<211> 138
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 23
acagaaagct tgccgccacc atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt 60
taaaaggtgt ccagtgtgag gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg 120
gcggctccct gcgcctgt 138

<210> 24
<211> 135
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 24
gccgccggag cggatggagg ccacccactc caggcccttg ccgggggcct ggcgcaccca 60
ggacatgccg tagttggaga aggtgaagcc ggaggcggcg caggacaggc gcagggagcc 120
gccgggctgc accag 135

<210> 25
<211> 142
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 25
ctggagtggg tggcctccat ccgctccggc ggcggccgca cctactactc cgacaacgtg 60
aagggccgct tcaccatctc ccgcgacaac gccaagaact ccctgtacct gcagatgaac 120
tccctgcgcg ccgaggacac cg 142

<210> 26
<211> 144
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 26
ctgcaaggat ccactcaccg gaggacacgg tcaccagggt gccctggccc cagtagtcgg 60
aggagccgga gtagtggtcg tagcgcacgc agtagtacag ggcggtgtcc tcggcgcgca 120
gggagttcat ctgcaggtac aggg 144

<210> 27
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 27
gccgccggag cggatg 16

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 28
ctggagtggg tggcctccat 20

<210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 29
tccgcaagct tgccgccac 19

<210> 30
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 30
aattctagga tccactcacg cttgatctc 29

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 31
acagaaagct tgccgccacc atg 23

<210> 32
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 32
ctgcaaggat ccactcaccg ga 22

<210> 33
<211> 10

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido interno

<400> 33
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 402
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3D6 versión 1 VL

<400> 34
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggctacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtcc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300
aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
ttccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 35
<211> 402
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3D6 versión 2 VL

<400> 35
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggcgacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgc ccgtgacccc cggcgagccc 120
gcctccatct cctgcaagtc ctcccagtcc ctgctggact ccgacggcaa gacctacctg 180
aactggctgc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagcgcc tgatctacct ggtgtccaag 240
ctggactccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300
aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctggca gggcacccac 360
ttccccgca ccttcggcca gggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 36
<211> 414
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3D6 versión 1 VH

<400> 36
atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgcgccgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240

322
323

gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccctgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctcc 414

<210> 37
<211> 414
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> h3D6 versión 2 VH

<400> 37
atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgc tggagtccgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggctccct gcgcctgtcc 120
tgcgccgcct ccggcttcac cttctccaac tacggcatgt cctgggtgcg ccaggccccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt ggcctccatc cgctccggcg gcggccgcac ctactactcc 240
gacaacgtga agggccgctt caccatctcc cgcgacaact ccaagaacac cctgtacctg 300
cagatgaact ccctgcgcgc cgaggacacc gccgtgtact actgcgtgcg ctacgaccac 360
tactccggct cctccgacta ctggggccag ggcaccctgg tgaccgtgtc

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y de derecho exclusivo:

1) Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:2, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la 3D6 de ratón, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de:

a) un residuo que de manera no covalente se une al antígeno directamente;
b) un residuo adyacente a una CDR;
c) Un residuo que interactúa con la CDR; y
d) Un residuo que participa en la interfase VL-VH.

2) Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedadde región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:2, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la 3D6 de ratón, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de:

a) Un residuo que de manera no covalente se une al antígeno directamente;
b) Un residuo adyacente a una CDR;
c) Un residuo que interactúa con la CDR; y
d) Un residuo que participa en la interfase VL-VH.

3) La cadena ligera de la reivindicación 1, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante

el modelaje de la cadena ligera de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1CR9.

4) La cadena ligera de la reivindicación 1, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1NLD.

5) La cadena pesada de la reivindicación 2, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1OPG.

6) Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:2, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la 3D6 de ratón, donde el residuo de cuadro es un residuo capaz de afectar la conformación o función de la región variable de cadena ligera como lo identifica el análisis de un modelo tridimensional de la región variable.

7) Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:2, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la 3D6 de ratón, donde el residuo de cuadro es un residuo capaz de afectar la conformación o función de la región variable de cadena pesada como lo identifica el análisis de un modelo tridimensional de la región variable.

8) La cadena ligera de la reivindicación 6, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de un residuo capaz de interactuar con un antígeno, un residuo próximo al sitio de unión del antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo dentro del área de 6 Å de un residuo CDR, un residuo de zona vernier, un residuo de empaque intercadenas, un residuo raro, y un residuo de sitio glicosilación sobre la superficie del modelo estructural.

9) La cadena pesada de la reivindicación 7, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de un residuo capaz de interactuar con un antígeno, un residuo próximo al sitio de unión del antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo dentro del área de 6 Å de un residuo CDR, un residuo canónico, un residuo de zona vernier, un residuo de empaque intercadenas, un residuo inusual, y un residuo de sitio glicosilación sobre la superficie del modelo estructural.

10) La cadena ligera de la reivindicación 6 u 8, donde el residuo de cuadro es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1CR9.

11) La cadena ligera de la reivindicación 6 u 8, donde el residuo de cuadro es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1NLD.

12) La cadena pesada de la reivindicación 7 o 9, donde el residuo de cuadro es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 3D6 basado en la estructura resuelta de 1OPG.

13) Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedadde región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:2, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro seleccionado del grupo que

consta de L1, L2, L36 y L46 (convención numérica de Kabat) sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la 3D6 de ratón.

14) Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 3D6 como se presenta en SEQ ID NO:4, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro seleccionado del grupo que consta de H49, H93 y H94 (convención numérica de Kabat) sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la 3D6 de ratón.

15) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8, 10; 11 y 13, donde la cadena ligera del receptor humano es del subtipo kappa II (convención de Kabat).

16) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 2, 5, 7, 9 y 14, donde la cadena pesada del receptor humano es del subtipo kappa III (convención de Kabat).

17) La cadena ligera de la reivindicación 15, donde la cadena ligera del receptor humano es seleccionada del grupo que consta de Kabat ID 019230, Kabat ID 051131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID U21040 y Kabat ID U41645.

18) La cadena ligera de la reivindicación 15, donde la cadena ligera del receptor humano es Kabat ID 019230.

19) La cadena pesada de la reivindicación 16, donde la cadena pesada del receptor humano es seleccionada del grupo que consta de Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 y Kabat ID M23691.

20) La pesada de la reivindicación 16, donde la cadena pesada del receptor humano es Kabat ID 045919.

21) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 y 18, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido que es común para las secuencias de cadena ligera variable en dicha posición.

22) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 y 18, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido de una secuencia de cadena ligera variable de línea de germinación.

23) La cadena ligera de la reivindicación 22, donde la secuencia de cadena variable línea de germinación se selecciona del grupo que consta de A1, A17, A18, A2 y A19.

24) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido que es común para las secuencias de cadena pesada variable en dicha posición.

25) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido de una secuencia de cadena pesada variable de línea de germinación.

26) La cadena pesada de la reivindicación 25, donde la secuencia de cadena variable línea de germinación se selecciona del grupo que consta de VH3-48, VH3-23, VH3-7, VH3-21 y VH3-11.

27) La cadena pesada de la reivindicación 25, donde la secuencia de cadena variable línea de germinación es VH3-23.

28) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, donde el residuo de cuadro humano raro es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en menos del 10% de las secuencias de región variable de cadena ligera humana en el subgrupo de región variable de cade-

na ligera, y el residuo común es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en más de 50% de las secuencias en el subgrupo de región variable de cadena ligera.

29) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, donde el residuo de cuadro humano raro es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en menos del 10% de las secuencias de región variable de cadena pesada humana en el subgrupo de región variable de cadena pesada, y el residuo común es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en más de 50% de las secuencias en el subgrupo de región variable de cadena pesada.

30) Una cadena ligera comprendiendo las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) y los residuos de cuadro de región variable L1, L2, L36 y L46 (convención numérica de Kabat) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 3D6, donde el remanente de la cadena ligera es de una inmunoglobulina humana.

31) Una cadena pesada comprendiendo las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) y los residuos de cuadro de región variable H49, H93 y H94 (convención numérica de Kabat) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 3D6, donde el remanente de la cadena pesada es de una inmunoglobulina humana.

32) Una inmunoglobulina humanizada comprendiendo la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 y 18, y la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20, o fragmento antígeno de dicha inmunoglobulina.

33) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

34) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-8} M.

35) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

36) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, donde el isotipo de la cadena pesada es γ1.

37) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, la cual se une tanto al péptido amiloideo beta (Aβ) soluble como al Aβ agregado.

38) La inmunoglobulina de la reivindicación 37, donde el péptido amiloideo beta (Aβ) soluble es Aβ desagregado.

39) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, la cual media la fagocitosis del péptido amiloideo beta (Aβ).

40) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, la cual atraviesa la barrera sangre-cerebro en un paciente.

41) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 32, la cual reduce tanto la carga del péptido amiloideo beta (Aβ) y la distrofia neurítica en un paciente.

42) Una inmunoglobulina humanizada comprendiendo una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada, donde

a) la cadena ligera humanizada comprende tres regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) teniendo secuencias amino ácido de las correspondientes regiones de determinación de complementariedad del dominio variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón 3D6 denominada SEQ ID NO:2, y un cuadro de región variable de una secuencia de cuadro de región variable de cadena ligera humana bajo la condición de que al menos una posición seleccionada de un primer grupo

que consta de L1, L2, L36 y L46 (convención numérica de Kabat) sea ocupada por el mismo residuo de amino ácido presente en la posición equivalente del cuadro de región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón 3D6; y

b) la cadena pesada humanizada comprende tres regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) teniendo secuencias amino ácido de las correspondientes regiones de determinación de complementariedad del dominio variable de cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón 3D6 denominada SEQ ID NO:4, y un cuadro de región variable de una secuencia de cuadro de región variable de cadena pesada humana bajo la condición de que al menos una posición seleccionada de un segundo grupo que consta de H49, H93 y H94 (convención numérica de Kabat) sea ocupada por el mismo residuo de amino ácido presente en la posición equivalente del cuadro de región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón 3D6

donde la inmunoglobulina humanizada se une específicamente al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M, donde la inmunoglobulina 3D6 tiene la cadena ligera con un dominio variable denominado SEQ ID NO:2 y la cadena pesada con un dominio variable denominado SEQ ID NO:4.

43) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena ligera humana es de una región variable de cadena ligera kappa.

44) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena pesada humana es de una región variable de cadena pesada IgG1.

45) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena ligera humanizada es de una cadena ligera seleccionada del grupo que consta de Kabat ID 019230, Kabat ID 05131, Kabat ID 005058, Kabat ID 005057, Kabat ID U21040 y Kabat ID U41645..

46) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena pesada humanizada es de una cadena pesada seleccionada del grupo que consta de Kabat ID 045919, Kabat ID 000459, Kabat ID 000553, Kabat ID 000386 y Kabat ID M23691.

47) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena ligera humanizada es idéntica a la secuencia de cuadro de región variable de cadena ligera Kabat ID 019230 excepto por al menos cuatro posiciones del primer grupo, y el cuadro de región variable de cadena pesada humanizada es idéntica a la secuencia de cuadro de región variable de cadena pesada Kabat ID 045919 excepto por al menos tres posiciones del segundo grupo.

48) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde la cadena ligera humanizada comprende regiones de determinación de complementariedad que son idénticas a las regiones de determinación de complementariedad correspondientes de la cadena ligera de ratón 3D6, y la cadena pesada humanizada comprende regiones de determinación de complementariedad que son idénticas a las regiones de determinación de complementariedad correspondientes de la cadena pesada de ratón 3D6.

49) Un anticuerpo humanizado comprendiendo regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de cadena ligera variable 3D6 presentada como SEQ ID NO:2.

50) Un anticuerpo humanizado comprendiendo regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de cadena pesada variable 3D6 presentada como SEQ ID NO:4.

51) Un anticuerpo o fragmento de unión al antigeno del mismo, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ), comprendiendo una región variable que comprende regiones de determinación de complementariedad (CDRs) que corresponden a las CDRs del anticuerpo de ratón 3D6.

52) Un anticuerpo que se une al péptido amiloideo beta (Aβ), comprendiendo:

a) un dominio variable de cadena ligera comprendiendo residuos amino ácidos (CDRs) de región de determinación de complementariedad de murina 3D6 y residuos amino ácidos de región de cuadro (FR) de dominio variable humano VL subgrupo II; y

b) un dominio variable de cadena pesada comprendiendo residuos amino ácidos (CDRs) de región de determinación de complementariedad de murina 3D6 y residuos amino ácidos de región de cuadro (FR) de dominio variable humano VH subgrupo III.

53) Una inmunoglobulina quimérica comprendiendo regiones de determinación de complementariedad (CDRs) de región variable de las secuencias de región variable de inmunoglobulina 3D6 presentadas como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, y comprendiendo regiones de cuadro variable de inmunoglobulina de un receptor humano.

54) Una inmunoglobulina, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, comprendiendo una región de cadena pesada variable como se presenta en SEQ ID NO:8 y una región de cadena ligera variable como se presenta en SEQ ID NO:5.

55) Una inmunoglobulina, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, comprendiendo una región de cadena pesada variable como se presenta en SEQ ID NO:12 y una región de cadena ligera variable como se presenta en SEQ ID NO:11.

56) Una inmunoglobulina comprendiendo una región de cadena pesada variable presentadas como SEQ ID NO:8; y una región de cadena ligera variable como se presenta en SEQ ID NO:5, y regiones constantes de IgG1.

57) Una inmunoglobulina comprendiendo una región de cadena pesada variable presentadas como SEQ ID NO:12; y una región de cadena ligera variable como se presenta en SEQ ID NO:11, y regiones constantes de IgG1.

58) Un método para prevenir o tratar una enfermedad amiloideogénica en un paciente, comprendiendo la administración al paciente de una dosificación efectiva de la inmunoglobulina humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 32-52.

59) Un método para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, comprendiendo la administración al paciente de una dosificación efectiva de la inmunoglobulina humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 32-52.

60) El método de la reivindicación 59, donde la dosificación efectiva de la inmunoglobina humanizada es 1 mg/kg de peso corporal. (Nina confirmará las dosificaciones)

61) El método de la reivindicación 59, donde la dosificación efectiva de la inmunoglobina humanizada es 10 mg/kg de peso corporal.

62) Una composición farmacéutica comprendiendo la inmunoglobulina de cualquiera de reivindicaciones 32-52 y un portador farmacéutico.

63) Un polipéptido aislado comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:2 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2.

64) Un polipéptido aislado comprendiendo amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2.

65) Un polipéptido aislado comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:4 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 31-35 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 50-66 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 99-107 de SEQ ID NO:4.

66) Un polipéptido aislado comprendiendo amino ácidos 31-35 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 50-66 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 99-107 de SEQ ID NO:4.

67) Un polipéptido aislado comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:2.

68) Un polipéptido aislado comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:4.

69) Una variante de un polipéptido comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:2; dicha variante comprendiendo al menos una sustitución de amino ácido conservativa, donde la variante retiene la habilidad de dirigir unión especifica hacia el péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

70) Una variante de un polipéptido comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:4; dicha variante comprendiendo al menos una sustitución de amino ácido conservativa, donde la variante retiene la habilidad de dirigir unión especifica hacia el péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

71) Un polipéptido aislado comprendiendo residuos 1-112 de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2 o comprendiendo residuos 1-119 de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:4.

72) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 17 y 18.

73) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 20.

74) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 64-71.

75) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 32-57.

76) Una molécula de ácido nucleico aislada comprendiendo la secuencia nucletoide de SEQ ID NO:1 o 3.

77) Un vector comprendiendo la molécula de ácido nucleico cualquiera de las reivindicaciones 72-76.

78) Una célula portadora comprendiendo la molécula de ácido nucleico cualquiera de las reivindicaciones 72-76.

79) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula portadora de la reivindicación 45 bajo condiciones tales que el anticuerpo o fragmento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

80) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:2 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2, dicho método comprendiendo cultivar una célula portadora comprendiendo una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, bajo condiciones tales que el anticuerpo o fragmento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

81) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:4 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 31-35 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 50-66 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 99-107 de SEQ ID NO:4, dicho método comprendiendo cultivar una célula portadora comprendiendo una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, bajo condiciones tales que el anticuerpo o fragmento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

82) Un método para identificar residuos susceptibles de sustitución en una región de cuadro variable de inmunoglobulina humanizada 3D6 basado en una estructura de inmunoglobulina resuelta y el análisis de dicho modelo para buscar residuos capaces de afectar la conformación o función de la región variable de inmunoglobulina humanizada 3D6, de modo tal que dichos residuos susceptibles de sustitución son identificados.

83) El uso de una secuencia de región variable presentada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o una porción de la misma, en la producción de una imagen tridimensional de la inmunoglobulina 3d6, cadena de inmunoglobulina 3d6, o el dominio de la misma.

84) Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 10D5 como se presenta en SEQ ID NO:14, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la 10D5 de ratón, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de:

á) un residuo que de manera no covalente se une al antígeno directamente;
b) un residuo adyacente a una CDR;
c) Un residuo que interactúa con la CDR; y
d) Un residuo que participa en la interfase VL-VH.

85) Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedadde región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 10D5 como se presenta en SEQ ID NO:16, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la 10D5 de ratón, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de:

a) Un residuo que de manera no covalente se une al antígeno directamente;
b) Un residuo adyacente a una CDR;
c) Un residuo que interactúa con la CDR; y
d) Un residuo que participa en la interfase VL-VH.

86) La cadena ligera de la reivindicación 84, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 70% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

87) La cadena ligera de la reivindicación 84, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

88) La cadena ligera de la reivindicación 84, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 90% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

89) La cadena pesada de la reivindicación 85, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 70% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

90) La cadena pesada de la reivindicación 85, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

91) La cadena pesada de la reivindicación 85, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 90% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

92) Una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina 10D5 como se presenta en SEQ ID NO:14, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena ligera de la 10D5 de ratón, donde el residuo de cuadro es un residuo capaz de afectar la conformación o función de la región variable de cadena ligera como lo identifica el análisis de un modelo tridimensional de la región variable.

93) Una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada comprendiendo regiones de determinación de complementariedad de región variable (CDRs) a partir de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina 10D5 como se presenta en SEQ ID NO:16, y comprendiendo regiones de cuadro variable de una secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina del receptor humano, siempre y cuando que al menos un residuo de cuadro sea sustituido con el correspondiente residuo amino ácido de la secuencia de región variable de la cadena pesada de la 10D5 de ratón, donde el residuo de cuadro es un residuo capaz de afectar la conformación o función de la región variable de cadena pesada como lo identifica el análisis de un modelo tridimensional de la región variable.

94) La cadena ligera de la reivindicación 92, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de un residuo capaz de interactuar con un antígeno, un residuo próximo al sitio de unión del antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo dentro del área de 6 Å de un residuo CDR, un residuo de zona vernier, un residuo de empaque intercadenas, un residuo raro, y un residuo de sitio glicosilación sobre la superficie del modelo estructural.

95) La cadena pesada de la reivindicación 93, donde el residuo de cuadro se selecciona del grupo que consta de un residuo capaz de interactuar con un antígeno, un residuo

próximo al sitio de unión del antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo dentro del área de 6 Å de un residuo CDR, un residuo canónico, un residuo de zona vernier, un residuo de empaque intercadenas, un residuo inusual, y un residuo de sitio glicosilación sobre la superficie del modelo estructural.

96) La cadena ligera de la reivindicación 92 o 94, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 70% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

97) La cadena ligera de la reivindicación 92 o 94, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

98) La cadena ligera de la reivindicación 92 o 94, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena ligera de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena ligera de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 90% de identidad de secuencia con la cadena ligera 10D5.

99) La cadena pesada de la reivindicación 93 o 95, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 70% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

100) La cadena pesada de la reivindicación 93 o 95, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

101) La cadena pesada de la reivindicación 93 o 95, donde un residuo que interactúa con la CDR es identificado mediante el modelaje de la cadena pesada de 10D5 basado en la estructura resuelta de una cadena pesada de inmunoglobulina de murina que comparte al menos 90% de identidad de secuencia con la cadena pesada 10D5.

102) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 84, 86-88,92,94 y 96-98, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido que es común para las secuencias de cadena ligera variable en dicha posición.

103) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 84, 86-88,92,94 y 96-98, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido de una secuencia de cadena ligera variable de línea de germinación.

104) La cadena ligera de la reivindicación 103, donde la secuencia de cadena ligera variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 70% de identidad con la secuencia de cadena ligera variable de identidad de secuencia.

105) La cadena ligera de la reivindicación 103, donde la secuencia de cadena ligera variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia de cadena ligera variable de identidad de secuencia.

106) La cadena ligera de la reivindicación 103, donde la secuencia de cadena ligera variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 90% de identidad con la secuencia de cadena ligera variable de identidad de secuencia.

107) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 85, 89-91,93 y 99-101, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido que es común para las secuencias de cadena pesada variable en dicha posición.

108) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 85, 89-91,93 y 99-101, donde al menos un residuo de cuadro humano raro es sustituido con un residuo amino ácido de una secuencia de cadena pesada variable de línea de germinación.

109) La cadena pesada de la reivindicación 108, donde la secuencia de cadena pesada variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 70% de identidad con la secuencia de cadena pesada variable de identidad de secuencia.

110) La cadena pesada de la reivindicación 108, donde la secuencia de cadena pesada variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia de cadena pesada variable de identidad de secuencia.

111) La cadena pesada de la reivindicación 108, donde la secuencia de cadena pesada variable de línea de germinación es aquella de una inmunoglobulina que comparte al menos 90% de identidad con la secuencia de cadena pesada variable de identidad de secuencia.

112) La cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 102-106, donde el residuo de cuadro humano raro es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en menos del 10% de las secuencias de región variable de cadena ligera humana en el subgrupo de región variable de cadena ligera, y el residuo común es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en más de 50% de las secuencias en el subgrupo de región variable de cadena ligera.

113) La cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 107-111, donde el residuo de cuadro humano raro es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en menos del 10% de las secuencias de región variable de cadena pesada humana en el subgrupo de región variable de cadena pesada, y el residuo común es seleccionado basándose en la ocurrencia en esa posición en más de 50% de las secuencias en el subgrupo de región variable de cadena pesada.

114) Una inmunoglobulina humanizada comprendiendo la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 84, 86-88, 92, 94 y 96-98, y la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 85, 89-91 y 93 y 99-101, o fragmento de unión antígeno de dicha inmunoglobulina.

115) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

116) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-8} M.

117) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, el cual específicamente se une al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-9} M.

118) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, donde el isotipo de la cadena pesada es γ1.

119) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, la cual se une tanto al péptido amiloideo beta (Aβ) agregado.

120) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, la cual media la fagocitosis del péptido amiloideo beta (Aβ).

121) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, la cual atraviesa la barrera sangre-cerebro en un paciente.

122) La inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 114, la cual reduce la carga del péptido amiloideo beta (Aβ) en un paciente.

123) Una inmunoglobulina humanizada comprendiendo una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada, donde

a) la cadena ligera humanizada comprende tres regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) teniendo secuencias amino ácido de las correspondientes regiones de determinación de complementariedad del dominio variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón 10D5 denominada SEQ ID NO:14, y un cuadro de región variable de una secuencia de cuadro de región variable de cadena ligera humana bajo la condición de que al menos una posición seleccionada del grupo que consta de un residuo canónico, un residuo vernier, un residuo de empaque y un residuo raro sea ocupada por el mismo residuo de amino ácido presente en la posición equivalente del cuadro de región variable de cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón 10D5; y

b) la cadena pesada humanizada comprende tres regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) teniendo secuencias amino ácido de las correspondientes regiones de determinación de complementariedad del dominio variable de cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón 10D5 denominada SEQ ID NO:14, y un cuadro de región variable de una secuencia de cuadro de región variable de cadena pesada humana bajo la condición de que al menos una posición seleccionada del grupo que consta de un residuo canónico, un residuo vernier, un residuo de empaque y un residuo raro sea ocupada por el mismo residuo de amino ácido presente en la posición equivalente del cuadro de región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón 10D5;

donde la inmunoglobulina humanizada se une específicamente al péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M, donde la inmunoglobulina 10D5 tiene la cadena ligera con un dominio variable denominado SEQ ID NO:14 y la cadena pesada con un dominio variable denominado SEQ ID NO:16.

124) La inmunoglobulina de la reivindicación 123, donde el cuadro de región variable de cadena ligera humana es de una región variable de cadena ligera kappa.

125) La inmunoglobulina de la reivindicación 123, donde el cuadro de región variable de cadena pesada humana es de una región variable de cadena pesada IgG1.

126) La inmunoglobulina de la reivindicación 123, donde el cuadro de región variable de cadena ligera humana es de una cadena ligera de inmuoglobulina humana que posee al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de cadena ligera de la inmunoglobulina 10D5.

127) La inmunoglobulina de la reivindicación 42, donde el cuadro de región variable de cadena pesada humana es de una cadena pesada de inmuoglobulina humana que posee al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de cadena pesada de la inmunoglobulina 10D5.

128) La inmunoglobulina de la reivindicación 123, donde la cadena ligera humanizada comprende regiones de determinación de complementariedad que son idénticas a las regiones de determinación de complementariedad correspondientes de la cadena ligera de ratón 10D5, y la cadena pesada humanizada comprende regiones de determinación de complementariedad que son idénticas a las regiones de determinación de complementariedad correspondientes de la cadena pesada de ratón 10D5.

129) Un anticuerpo humanizado comprendiendo regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de cadena ligera variable 10D5 presentada como SEQ ID NO:14.

130) Un anticuerpo humanizado comprendiendo regiones de determinación de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de la secuencia de cadena pesada variable 10D5 presentada como SEQ ID NO:16.

131) Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno del mismo, el cual específicamente se une al pép-

tido amiloideo beta (Aβ), comprendiendo una región variable que comprende regiones de determinación de complementariedad (CDRs) que corresponden a las CDRs del anticuerpo de ratón 10D5.

132) Una inmunoglobulina quimérica comprendiendo regiones de secuencia variable sustancialmente como se presenta en SEQ ID NO:14 o SEQ ID NO:16, y comprendiendo secuencias de región constante de una inmunoglobulina humana.

133) Un método para prevenir o tratar una enfermedad amiloideogénica en un paciente, comprendiendo la administración al paciente de una dosificación efectiva de la inmunoglobulina humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 114-131.

134) Un método para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, comprendiendo la administración al paciente de una dosificación efectiva de la inmunoglobulina humanizada de cualquiera de las reivindicaciones 114-131.

135) El método de la reivindicación 134, donde la dosificación efectiva de la inmunoglobina humanizada es 1 mg/kg de peso corporal.

136) El método de la reivindicación 134, donde la dosificación efectiva de la inmunoglobina humanizada es 10 mg/kg de peso corporal.

137) Una composición farmacéutica comprendiendo la inmunoglobulina de cualquiera de reivindicaciones 114-131 y un portador farmacéutico.

138) Un polipéptido aislado comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:2 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2.

139) Un polipéptido aislado comprendiendo amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2.

140) Un polipéptido aislado comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:4 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 31-37 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 52-67 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 100-112 de SEQ ID NO:4.

141) Un polipéptido aislado comprendiendo amino ácidos 31-37 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 52-67 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 100-112 de SEQ ID NO:4.

142) Un polipéptido aislado comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:14.

143) Un polipéptido aislado comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:16.

144) Una variante de un polipéptido comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:14; dicha variante comprendiendo al menos una sustitución de amino ácido conservativa; donde la variante retiene la habilidad de dirigir unión específica hacia el péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

145) Una variante de un polipéptido comprendiendo secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO:4; dicha variante comprendiendo al menos una sustitución de amino ácido conservativa, donde la variante retiene la habilidad de dirigir unión específica hacia el péptido amiloideo beta (Aβ) con una afinidad de unión de al menos 10^{-7} M.

146) Un polipéptido aislado comprendiendo residuos 1-112 de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:14 o comprendiendo residuos 1-123 de la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:16.

147) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la cadena ligera de cualquiera de las reivindicaciones 84, 86-88, 94 y 96-98.

148) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la cadena pesada de cualquiera de las reivindicaciones 85, 89-91, 93, y 99-101.

149) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 139-146.

150) Una molécula de ácido nucleico aislada codificando la inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 114-132.

151) Una molécula de ácido nucleico aislada comprendiendo la secuencia nucletoide de SEQ ID NO:13 o 15.

152) Un vector comprendiendo la molécula de ácido nucleico cualquiera de las reivindicaciones 147-151.

153) Una célula portadora comprendiendo la molécula de ácido nucleico cualquiera de las reivindicaciones 147-151.

154) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende cultivar la célula portadora de la reivindicación 153 bajo condiciones tales que el anticuerpo o fragmento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

155) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:2 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 24-39 de SEQ ID NO:2; amino ácidos 55-61 de SEQ ID NO:2; y amino ácidos 94-102 de SEQ ID NO:2, dicho método comprendiendo cultivar una célula portadora comprendiendo una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, bajo condiciones tales que el anticuerpo o fragmento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

156) Un método para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, comprendiendo un fragmento de SEQ ID NO:4 seleccionado del grupo que consta de amino ácidos 31-37 de SEQ ID NO:4; amino ácidos 52-67 de SEQ ID NO:4; y amino ácidos 100-112 de SEQ ID NO:4, dicho método comprendiendo cultivar una célula portadora comprendiendo una molécula de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, bajo condiciones tales que el anticuerpo o frag-

mento es producido y aislar dicho anticuerpo de la célula portadora o del cultivo.

157) Un método para identificar residuos susceptibles de sustitución en una región de cuadro variable de inmunoglobulina humanizada 10D5 basado en una estructura de inmunoglobulina resuelta y el análisis de dicho modelo para buscar residuos capaces de afectar la conformación o función de la región variable de inmunoglobulina humanizada 10D5, de modo tal que dichos residuos susceptibles de sustitución son identificados.

158) El uso de una secuencia de región variable presentada como SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o una porción de la misma, en la producción de una imagen tridimensional de la inmunoglobulina 3d6, cadena de inmunoglobulina 3d6, o el dominio de la misma.

p.:NEUTRALAB LIMITED

ANTICUERPOS HUMANIZADOS QUE RECONOCEN EL PÉPTIDO AMILOIDEO BETA

RESUMEN

La invención brinda métodos y agentes mejorados para el tratamiento de enfermedades asociadas a los depósitos amiloideos de Aβ en el cerebro de un paciente. Los agentes preferidos incluyen anticuerpos humanizados.

350
351

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2 Radicacion : 03056705 00000000 Folios: 350
Fecha (AMD): 2003-07-04 17:58:54
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 44,021
FECHA : JUNIO 24 DE 2003

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	11076229	24/06/2003	26,973,000.00

C O N C E P T O

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL : $	400.000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdo 13798-841-001-5.

81
352

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN ✓ **MODELO DE UTILIDAD**	( )	( )
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	( )	( )
- Descripcion de la invencion	( )	( )
- Dibujos de ser estos pertinentes	( )	( )
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas		
COMPLETA ( ) **INCOMPLETA**	( )	( )
DISEÑO INDUSTRIAL ( )		
- Indicación de que se solicita el registro de 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 ( )		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	( )	( )
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	( )	( )
Representación gráfica del esquema de trazado	( )	( )
Comprobante de pago de las tasas establecidas	( )	( )
COMPLETA ( ) **INCOMPLETA**	( )	( )

Firma Responsable

Fecha

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03056705 [redacted] Folios 350
Fecha (AMD) 2003-07-04 17:58 54
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES