



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-8403

21 EXPEDIENTE N°

54 TÍTULO "ANTICUERPOS DE GLICOPROTEINA ASOCIADA CON ANTI-MIELINA (MAG)"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71 SOLICITANTE GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO MIDDLESEX, INGLATERRA

74 REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T P 53.215

22 BOGOTÁ, D.C. -1 FEB 2005

CF

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 05000403 00000000 Folios: 130
 Fecha (APP): 2005-02-01 16:44:33
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
 Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 06-Marzo-2005

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **GLAXO GROUP LIMITED**

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

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Inglaterra
 Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales
 Teléfono: 3264270 Fax: 6069701
 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701
 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **ELLIS, Jonathan, Henry y GERMASCHEWSKI, Volker.**

Dirección: GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY.

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2003/008749

Fecha: 05/08/03

Publicación Internacional No. WO 2004/014953 A3

Fecha: 19/02/04

⑥

Título (54): "ANTICUERPOS DE GLICOPROTEINA ASOCIADA CON ANTI-MIELINA (MAG) "

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB

06.08.2002

0218230.1

GB

06.08.2002

0218232.7

GB

06.08.2002

0218234.3

GB

06.08.2002

0218229.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05-7,556

Fecha: Febrero 1 de 2005

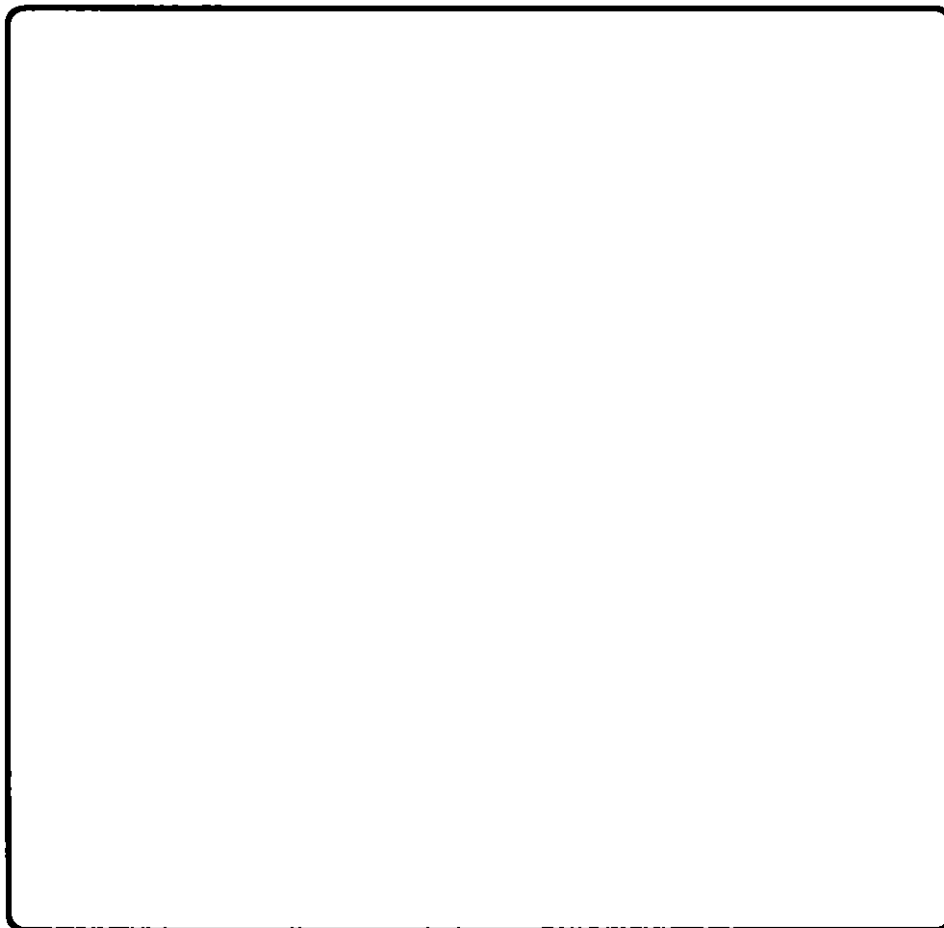
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén.

T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05000403 00000000 Folios: 130
Fecha (MD): 2005-02-01 16:44:33
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 7,556
FECHA : FEBRERO 1 DE 2005

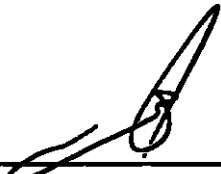
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30609497	01/02/2005	596,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

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


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

4

del Poder otorgado e
de 2003, una copia d

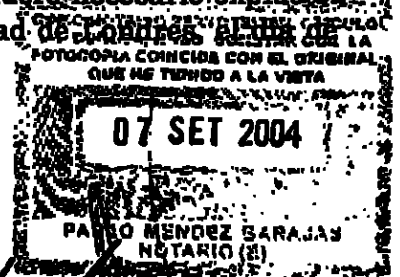
Y QUE los objetos p
de los objetos o activ
Constitutiva y los Es

Y PARA QUE CON
presente Certificado
hoy veintiseis de ago



**SCRIVENER
NOTARIES**

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



Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



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

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martín F. Buchner**

COMO NOTARIO PUBLICO EN LA CAPACIDAD DE
FOTOCOPIA CONFECCIONADA POR EL
QUE SE TIENE A LA VISTA

07 SET 2004
The Said Notary Public

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

at London/Londres
PARLO MENJERZ
HOI-217
by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

3. Number/No **G499865**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **M. Monaghan**



For the Secretary of State Pour le Secrétaire d'Etat

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

TA
AL
des
repr
adm
trám
efect.
dori
indica
recurs
descrip.
sciclitu
ins:ourz
parci:lr
impu: st
dele: rin.
y va ure:
cualesqui
las medid:
de nuestn
oposición,
quedan far
demandant
sean comp
árbitros, de:
demás facul
presente del
cuanto dichos
cualqu de
beneficio.

Asimlamc
LLOREDA y/o
SANTAMARIA
solicitar en la
protocolización c
poder que cualq
nuestro.

Dado y firmado

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

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

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

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

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

Dado y firmado

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

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

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

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

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

Given and signed this

23 AUG 2004

Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorized Officer

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

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

PODER

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

Notarización del documento es español.

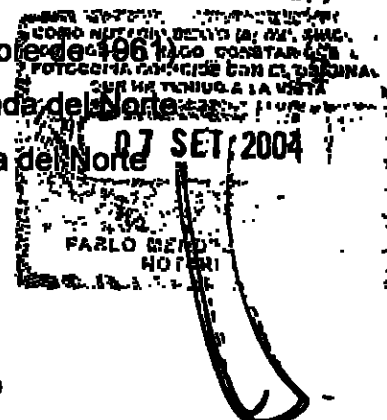
Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

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

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado por Martin E Buchner
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público



CERTIFICADO

- | | |
|--|-----------------------------|
| 5. en Londres | 6. el 26 de agosto de 2004. |
| 7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth | |
| 8. Número G499865 | |
| 9. Sello/Estampilla | 10. Firma: (ilegible) |
| Sello de la Oficina de Asuntos | M. Monaghan |

TRANSDUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

67

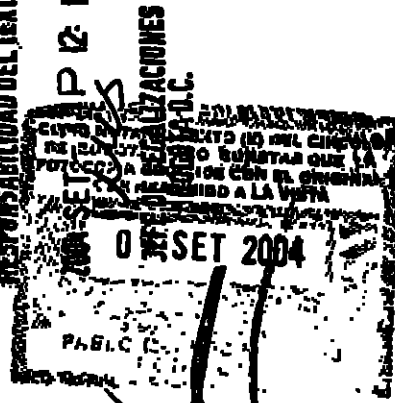
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258650

Ana Escobar
Cuya firma aparece en el
documento de empresa
las funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

P 12:12



Exteriores y del Commonwealth

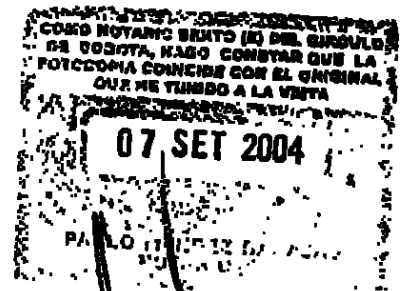
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Folios 8, 9 y 10
fanzetas y extracto

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP03/08749

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 A61K 39/395 A61P25/00 C07K16/28

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7: A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-INTERNO, Dato WPI, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 95 22344 A (BRAUN PETER ERICH ; MCKERRACHER LISA JOAN (CA); UNIV MCGILL (CA); D) 24 de agosto de 1995 (1995-08-24) página 16, línea 21-página 18, línea 34 página 21, línea 3-línea 14; reivindicaciones 4-7	1-6 12-16
X	WO 01 62907 A (MEDICAL & BIOLOG LAB CO LTD ; IBA YOSHITAKA (JP); AKAHORI YASUSHI () 30 de agosto de 2001 (2001-08-30) figura 54	1-5
A	WO 98 12329 A (REED GUY L) 26 de marzo de 1998 (1998-03-26) figuras 15, 16	1-6

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

*** Categorías especiales de documentos citados:**

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

5 de marzo de 2004

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

19/03/2004

Nombre y dirección del correo de ISA

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

Funcionario autorizado

Le Flao, K

Forma PCT ISA/ 210 (segunda hoja) (Julio 1992)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08749

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
P,X	WO 02 062383 A (VINSON MARY ; IRVING ELAINE ALISON (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB) 15 de agosto de 2002 (2002-08-15) reivindicación 7	1-5 17-26
A	WO 99 25378 A (EURO CELTIQUE SA) 27 de mayo de 1999 (1999-05-27) reivindicación 6	1-26
A	WO 99 53945 A (BRAUN PETER ERICH ; MCKERRACHER LISA JOAN (CA); DAVID SAMUEL (CA) 28 de octubre de 1999 (1999-10-28) reivindicaciones 1-23	1-26

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP 03/08749

Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

- ☒ Reivindicaciones Nos.:
 porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

 aunque las reivindicaciones 18, 20, 22-25 están dirigidas al método del tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados de la composición
- ☐ Reivindicaciones Nos.:
 porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

 ver SIGUIENTE INFORMACION hoja PCT/ISA/210
- ☐ Reivindicaciones No.:
 porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

- ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
- ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
- ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
- ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/08749

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9522344 A	24-08-1995	AU 1703595 A CA 2183630 A1 WO 9522344 A1	04-09-1995 24-08-1995 24-08-1995
WO 0162907 A	30-08-2001	AU 3412501 A EP 1264885 A1 WO 0162907 A1	03-09-2001 11-12-2002 30-08-2001
WO 9812329 A	26-03-1998	AU 734997 B2 AU 4413497 A AU 741338 B2 AU 4413597 A CA 2266339 A1 CA 2266341 A1 EP 0937146 A2 EP 0941345 A2 JP 2001515345 T JP 2001502895 T WO 9812329 A2 WO 9812334 A2 US 6114506 A US 2003017147 A1 US 2003031664 A1	28-06-2001 14-04-1998 29-11-2001 14-04-1998 26-03-1998 26-03-1998 25-08-1999 15-09-1999 18-09-2001 06-03-2001 26-03-1998 26-03-1998 05-09-2000 23-01-2003 13-02-2003
WO 02062383 A	15-08-2002	EP 1357941 A2 WO 02062383 A2	05-11-2003 15-08-2002
WO 9925378 A	27-05-1999	AU 763029 B2 AU 1459799 A AU 737457 B2 AU 1459899 A BR 9815289 A BR 9815580 A CA 2309990 A1 CA 2310269 A1 CN 1294517 T CN 1327388 T EP 1032420 A1 EP 1030684 A1 JP 2001526021 T JP 2002507544 T WO 9925378 A1 WO 925379 A1 US 2002028469 A1 ZA 900048 A ZA 9900049 A	10-07-2003 07-06-1999 23-08-2001 07-06-1999 26-12-2001 29-01-2002 27-05-1999 27-05-1999 09-05-2001 19-12-2001 06-09-2000 30-08-2000 18-12-2001 12-03-2002 27-05-1999 27-05-1999 07-03-2002 08-07-1999 09-03-2000
WO 9953945 A	28-10-199	AU 3134799 A WO 9953945 A1	08-11-1999 28-10-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/08749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/395 A61P25/00 C07K16/28

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 A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 22344 A (BRAUN PETER ERICH ; MCKERRACHER LISA JOAN (CA); UNIV MCGILL (CA); D) 24 August 1995 (1995-08-24) page 16, line 21 - page 18, line 34 page 21, line 3 - line 14; claims 4-7	1-6, 12-16
X	WO 01 62907 A (MEDICAL & BIOLOG LAB CO LTD ; IBA YOSHITAKA (JP); AKAHORI YASUSHI () 30 August 2001 (2001-08-30) figure 54	1-5
A	WO 98 12329 A (REED GUY L) 26 March 1998 (1998-03-26) figures 15,16	1-6
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ 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 claim or other special reason (as specified)
- *C* 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.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2004

Date of mailing of the international search report

19/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2911
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, fax 31 651 494 01,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/08749

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02 062383 A (VINSON MARY ; IRVING ELAINE ALISON (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB)) 15 August 2002 (2002-08-15) claim 7	1-5, 17-26
A	WO 99 25378 A (EURO CELTIQUE SA) 27 May 1999 (1999-05-27) claim 6	1-26
A	WO 99 53945 A (BRAUN PETER ERICH ; MCKERRACHER LISA JOAN (CA); DAVID SAMUEL (CA)) 28 October 1999 (1999-10-28) claims 1-23	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/08749

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. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 18, 20, 22-25 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ Claims Nos.:
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:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 84(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

The International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ 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.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522344 A	24-08-1995	AU 1703595 A CA 2183630 A1 WO 9522344 A1	04-09-1995 24-08-1995 24-08-1995
WO 0162907 A	30-08-2001	AU 3412501 A EP 1264885 A1 WO 0162907 A1	03-09-2001 11-12-2002 30-08-2001
WO 9812329 A	26-03-1998	AU 734997 B2 AU 4413497 A AU 741338 B2 AU 4413597 A CA 2266339 A1 CA 2266341 A1 EP 0937146 A2 EP 0941345 A2 JP 2001515345 T JP 2001502895 T WO 9812329 A2 WO 9812334 A2 US 6114506 A US 2003017147 A1 US 2003031664 A1	28-06-2001 14-04-1998 29-11-2001 14-04-1998 26-03-1998 26-03-1998 25-08-1999 15-09-1999 18-09-2001 06-03-2001 26-03-1998 26-03-1998 05-09-2000 23-01-2003 13-02-2003
WO 02062383 A	15-08-2002	EP 1357941 A2 WO 02062383 A2	05-11-2003 15-08-2002
WO 9925378 A	27-05-1999	AU 763029 B2 AU 1459799 A AU 737457 B2 AU 1459899 A BR 9815289 A BR 9815580 A CA 2309990 A1 CA 2310269 A1 CN 1294517 T CN 1327388 T EP 1032420 A1 EP 1030684 A1 JP 2001526021 T JP 2002507544 T WO 9925378 A1 WO 9925379 A1 US 2002028469 A1 ZA 9900048 A ZA 9900049 A	10-07-2003 07-06-1999 23-08-2001 07-06-1999 26-12-2001 29-01-2002 27-05-1999 27-05-1999 09-05-2001 19-12-2001 06-09-2000 30-08-2000 18-12-2001 12-03-2002 27-05-1999 27-05-1999 07-03-2002 08-07-1999 09-03-2000
WO 9953945 A	28-10-1999	AU 3134799 A WO 9953945 A1	08-11-1999 28-10-1999

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
19 de Febrero de 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/014953 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/395,
A61P 25/00, C07K 16/28

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2003/008749

(22) Fecha de Registro Internacional: 5 de Agosto de 2003
(05.08.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0218230.1 6 de Agosto de 2002 (06.08.2002) GB
0218232.7 6 de Agosto de 2002 (06.08.2002) GB
0218234.3 6 de Agosto de 2002 (06.08.2002) GB
0218229.3 6 de Agosto de 2002 (06.08.2002) GB

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventores; e

(73) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos solamente): ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). GERMASCHESKI, Volker [DE/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB)..

(74) Agente: LEAROYD, Stephanie, Anne et al.; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Estados Designados (nacional): 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasítica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibir modificaciones

(88) Fecha de publicación del Reporte de Búsqueda Internacional
6 de mayo de 2004

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: ANTICUERPOS DE GLICOPROTEINA ASOCIADA CON ANTI-MIELINA (MAG)

(57) Resumen: La presente invención se refiere a anticuerpos alterados para glicoproteína asociada con mielina (MAG), formulaciones farmacéuticas que las contienen y al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades/trastornos neurológicos.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 February 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/014953 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395,
A61P 25/00, C07K 16/28

(74) Agents: LEAROYD, Stephanie, Anne et al.; Glaxo-
SmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex
TW8 9GS (GB).

(21) International Application Number:
PCT/GB2003/008749

(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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SI, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 5 August 2003 (05.08.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

0218230.1	6 August 2002 (06.08.2002)	GB
0218232.7	6 August 2002 (06.08.2002)	GB
0218234.3	6 August 2002 (06.08.2002)	GB
0218229.3	6 August 2002 (06.08.2002)	GB

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

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

Published:

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

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (*for US only*): ELLIS, Jonathan,
Henry (GB/GB); GlaxoSmithKline, Gunnels Wood
Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). GER-
MASCHIEWSKI, Volker (DE/GB); GlaxoSmithKline,
Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY
(GB).

(88) Date of publication of the international search report:
6 May 2004

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

WO 2004/014953 A3

(54) Title: ANTI-MYELIN ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (MAG) ANTIBODIES

(57) Abstract: The present invention relates to altered antibodies to myelin associated glycoprotein (MAG), pharmaceutical formu-
lations containing them and to the use of such antibodies in the treatment and/or prophylaxis of neurological diseases/disorders.

180

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)
 (Reporte justificado de acuerdo al anuncio del presidente de la EPO publicado en el OJ11/2001)

Registro de referencia del solicitante o agente SAL/PG4912	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 03/08749	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 05/08/2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 06/08/2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/28		
Solicitante GLAXO GROUP LIMITED ET AL.		
1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>2</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de hojas.		
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: - I ☒ Bases del Reporte - II ☐ Prioridad - III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. - IV ☐ Falta de unidad de invención - V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación . - VI ☐ Ciertos documentos citados - VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional - VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la demanda 18/02/2004	Fecha de terminación de este reporte 11/10/2004	
Nombre y dirección de correo autoridad de IPEA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk-Netherlands Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado BOUTRUCHE J E E Tel. (+49.89) 2399 2828	

I. Base del Reporte

La base de este examen preliminar internacional es la solicitud como fue presentada originalmente.

III. No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

La cuestión si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar un nivel inventivo, o ser industrialmente aplicable no ha sido el objeto del examen preliminar internacional con respecto a las reivindicaciones las cuales no han sido buscadas (Artículo 17(2)(a) ó (3) y Regla 66.1 (e) del PCT); ver también reporte de búsqueda internacional).

V. Declaración razonada según la Regla 66.2(a)(II) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial

En la medida en que el Examen Preliminar Internacional se ha realizado (ver ítem III arriba), se precisa lo siguiente:

A la luz de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, se considera que la invención según lo definido en por lo menos alguna de las reivindicaciones, la cual ha sido el objeto de un reporte de búsqueda internacional, no parece cumplir con los criterios mencionados en el Artículo 33(1) del PCT, i.e. no parece ser novedoso y/o involucrar un nivel inventivo (ver el reporte de búsqueda internacional, en particular los documentos citados X y/o Y y las correspondientes referencias a la reivindicación).

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

(Rationalised Report according to the Notice of the President of the EPO published in the OJ11/2001)

Applicant's or agent's file reference SAL/PG4912	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPRA/016)
International application No. PCT/EP03/08749	International filing date (day/month/year) 05/08/2003	Priority date (day/month/year) 06/08/2002
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/28		
Applicant GLAXO GROUP LIMITED ET AL.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following issues:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18/02/2004	Date of completion of this report 11/10/2004
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Netherlands Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer BOUTRUCHE J E E Tel. (+49-89) 2399 2828

Form PCT/IPEA/09 (cover sheet) P20476 (October 2002)



21

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(a) PCT); see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

24

**ANTICUERPOS DE GLICOPROTEÍNA ASOCIADA CON ANTI-MIELINA
(MAG)**

5 RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos alterados para glicoproteína asociada con mielina (MAG), formulaciones farmacéuticas que las contienen y al uso de dichos anticuerpos en el
10 tratamiento y/o profilaxis de enfermedades/trastornos neurológicos.

15

ANTICUERPOS DE GLICOPROTEINA ASOCIADA CON ANTI-MIELINA
(MAG)

CAMPO DE DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a anticuerpos alterados que se unen a glicoproteína asociada con mielina (MAG) y neutralizan la función de la misma, polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos, formulaciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurológicas. Otros aspectos, objetos y ventajas de la presente invención se volverán aparentes a partir de la siguiente descripción.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El derrame cerebral es la causa principal de muerte y discapacidad en el Mundo Occidental. No hay ninguna terapia aprobada para el tratamiento de derrame cerebral diferente de t-PA el cual tiene que ser administrado dentro de las tres horas del ataque después de una exploración CT para excluir la hemorragia. A la fecha la mayoría de los agentes terapéuticos que se dirigen hacia el tratamiento de derrame cerebral agudo (es decir, neuroprotección), tienen predominantemente involucrada la activación de receptores de glutamato y sus trayectorias de

señalización de corriente descendiente que se sabe que se involucran en la muerte aguda de células. Sin embargo a la fecha se ha probado que estas estrategias no son exitosas en evaluaciones clínicas y por lo general están asociadas con efectos laterales que limitan la dosis (Hill & Hachinski, The Lancet, 352: (suppl III) 10-14 (1998). Por consiguiente existe la necesidad de métodos novedosos dirigidos hacia la mejora de la muerte de células después de que cesa el flujo sanguíneo.

Después del ataque del derrame cerebral, se observó algún grado de recuperación funcional espontánea en muchos pacientes, sugiriendo que el cerebro tiene la habilidad (en cierto grado limitada) de repararse y/o remodelarse después del daño. Los agentes que tienen el potencial de mejorar esta recuperación pueden por lo tanto permitir la intervención que se hará después (potencialmente días) después del ataque de la isquemia cerebral. Los agentes son capaces de ofrecer tanto neuroprotección como recuperación funcional mejorada puede proveer ventajas significativas sobre las estrategias neuroprotectoras potenciales actuales.

Los mecanismos que subyacentes de recuperación funcional son actualmente conocidos. El desarrollo de axones dañados o no dañados ha sido propuesto como un mecanismo posible. Sin embargo, aunque los estudios *in vivo* han mostrado que el tratamiento de el daño en la espina dorsal o derrame cerebral con factores neurotróficos da como resultado la recuperación funcional mejorada y un grado de desarrollo de axones, esto no prueba un

enlace directo entre el grado de desarrollo de axones y la extensión de la recuperación funcional (Jakeman, y otros, 1998, *Exp. Neurol.*, 154: 170-184, Kawamata y otros, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 94:8179-8184, Ribotta y otros, 2000, *J. Neurosci.* 20: 5144-5152).

5 Además, el desarrollo de axones requiere una neurona viable. En las enfermedades tales como el derrame cerebral que están asociadas con una muerte de células extensiva, el mejoramiento de la recuperación funcional ofrecida por un agente dado después del derrame cerebral puede por consiguiente ser a través de mecanismos
10 diferentes del desarrollo de axones tales como la diferenciación de células de tallo endógenas, activación de trayectorias redundantes, cambios en la distribución del receptor o excitabilidad de neuronas o glia (Fawcett & Asher, 1999, *Brain Res. Bulletin*, 49: 377-391, Horner & Gage, 2000, *Nature* 407 963-970).

15 La habilidad limitada del sistema nervioso central (CNS) para reparar después del daño se cree, que en parte es debido a las moléculas dentro del ambiente CNS que tienen un efecto inhibitor sobre el desarrollo de axones (producto derivado de neuritas). El
mielina CNS se cree que contiene moléculas inhibitoras (Schwab ME
20 y Caroni P (1988). *J. Neurosci.*, 8, 2381-2193). Dos proteínas de mielina, glicoproteína asociada con mielina (MAG) y Nogo han sido clonados e identificados como inhibidores putativos del producto derivado de neurita (Sato S. y otros (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 163, 1473-1480; McKerracher L. y otros (1994) *Neuron* 13, 805-
25 811; Mukhopadhyay G y otros (1994) *Neuron* 13, 757-767; Torigoe K

y Lundborg G (1997) Exp. Neurology 150, 254-262; Schafer y otros (1996) Neuron 16, 1107-1113; WO9522344; WO9701352; Prinjha R y otros (2000) Nature 403, 383-384; Chen MS y otros (2000) Nature 403, 434-439; GrandPre T y otros (2000) Nature 403, 439-444; 5 US005250414A; WO200005364A1; WO0031235).

La glicoproteína asociada con mielina es una molécula de transmembrana de la superficie de la célula expresada en la superficie de la mielina que consiste de cinco dominios de inmunoglobulina extracelular, un dominio de transmembrana 10 individual, y un dominio Intracelular. La expresión de MAG está restringida a mielinización de glia en el CNS y sistema nervioso periférico (PNS). MAG se cree que interactúa con el receptor(es) neuronal el cual media los efectos en la citoesqueleto neuronal incluyendo la fosforilación del neurofilamento y la inhibición del 15 crecimiento de neurita *in vitro*. Aunque los antagonistas de MAG han sido postulados como útiles para la promoción del desarrollo de axones después del daño (WO9522344, WO9701352 y WO9707810), estas declaraciones no están soportadas por datos *in vivo*. Además, el papel de MAG como un inhibidor del crecimiento de axones a 20 partir de neuronas CMS *in vivo* no está probado (Li CM y otros (1994) Nature 369, 747-750; Montag, D y otros (1994) Neuron 13, 229-246; Lassmann H y otros (1997) GLIA 19, 104-110; Li C y otros (1998) J. Neuro. Res 51, 210-217; Yin X y otros (1998) J. Neurosci, 18, 1953-1962; Bartsch U y otros (1995) Neuron 15 1375-1381; Li M. 25 y otros (1996) 46, 404-414).

Los anticuerpos típicamente comprenden cadenas pesadas enlazadas juntas a través de enlaces de disulfuro y dos cadenas ligeras. Cada cadena ligera está enlazada a una cadena pesada respectiva a través de enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo y un dominio constante en su otro extremo. El dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada. Los dominios constantes están alineados con el primer dominio constante de la cadena pesada. Los dominios constantes en la cadena ligera y pesada no están involucrados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno.

Los dominios variables de cada par de cadenas ligera y pesada forman el sitio de unión del antígeno. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende una estructura de cuatro regiones, cuyas secuencias están relativamente conservadas, conectadas mediante tres regiones determinantes complementarias (CDRs), por lo general referidas como regiones hipervariables. Las cuatro regiones de estructura en su mayor parte adoptan una conformación de capa delgada beta y las CDRs forman los bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de capa ligera beta. Las CDRs se mantienen en una proximidad cercana a través de las

regiones de la estructura y, con las CDRs del otro dominio, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno. Las CDRs y las regiones de estructura de los anticuerpos puede ser determinadas a través de la referencia a Kabat y otros ("Secuencias de proteínas de interés inmunológico" Departamento de Salud y
5 Servicios Humanos de EUA, Oficina de Impresión del Gobierno de EUA, 1987).

Ahora se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal anti-MAG, descrito (Poltorak y otros (1987) Journal of Cell Biology 105, 1893-1899, DeBellard y otros (1996) Mol. Cell, Neurosci. 7, 89-101;
10 Tang y otros (1997) Mol.Cell, Neurosci. 9, 333-346; Torigoe K y Lundborg G (1997) Exp. Neurology 150, 254-262) y comercialmente disponible (MAB1567 (Chemicon)) cuando se administra ya sea directamente dentro del cerebro o intravenosamente después de la
15 isquemia cerebral focal en la rata (un modelo de derrame cerebral), proporciona neuroprotección y mejora la recuperación funcional. Por consiguiente los anticuerpos anti-MAG proporcionan agentes terapéuticos potenciales tanto para la neuroprotección aguda así como para la promoción de recuperación funcional después del
20 derrame cerebral. Este anticuerpo es un anticuerpo de murino. Aunque los anticuerpos de murino por lo general se utilizan como agentes de diagnóstico, su utilidad como un agente terapéutico ha sido probada solamente en algunos casos. Su aplicación limitada se debe en parte a la administración repetida de monoclonales de
25 murino en humanos, que usualmente provocan respuestas inmunes

humanas contra estas moléculas. Para superar estas propiedades indeseables intrínsecas de los anticuerpos "alterados" monoclonales de murino diseñados para incorporar regiones de anticuerpos humanos, han sido desarrollados y están bien establecidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado contiene complementaridad que determina las regiones ("CDRs) de origen no humano y la mayoría del resto de la estructura se deriva de un anticuerpo humano.

El proceso de neurodegeneración desarrolla muchas enfermedades/trastornos neurológicos incluyendo enfermedades agudas tales como derrame cerebral, daño traumático al cerebro, y daño a la espina dorsal así como enfermedades crónicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, demencias fronto-temporales (tauopatías), neuropatía periférica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y esclerosis múltiple. Las mabs anti-Mag por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de estas enfermedades/trastornos, tanto a través del mejoramiento de la muerte de células asociado con estas enfermedades/trastornos como promoviendo la recuperación funcional.

Todas las publicaciones, tanto de revista como de patente, descritas en la presente especificación están expresamente y enteramente incorporadas aquí por referencia.

C MPENDIO DE LA INVENCION

La invención provee un anticuerpo alterado o fragmento funcional del mismo, el cual se une a, y neutraliza MAG y comprende una o más de las siguientes CDRs. Las CDRs se identifican según descritas por Kabat y otros ("Secuencias de proteínas de interés inmunológico" Departamento de Salud y Servicios Humanos de EUA, publicación NIH No. 91-3242. Las CDRs preferiblemente son como se definen por Kabat, pero siguiendo los principios de la estructura de proteína y plegándose como se define a través de Chothia y Lesk, (Chothia y otros, (1989) Conformaciones de regiones hipervariables de Inmunoglobulina; Nature 342, p877-883), se apreciará que los residuos adicionales también pueden ser considerados como siendo parte de la región de unión del antígeno y de esta forma se abarcan a través de la presente invención.

CDRs de cadena ligera

CDR	<i>De acuerdo con Kabat</i>
L1	KSSHSVLYSSNQKNYLA (ID DE SECUENCIA NO: 1)
L2	WASTRES (ID DE SECUENCIA NO: 2)
L3	HQYLSSLT (ID DE SECUENCIA NO:3)

CDRs de cadena pesada

5

CDR	De acuerdo con Kabet
H1	NYGMN (ID DE SECUENCIA NO: 4)
H2	WINTYTGEPTYADDFTG (ID DE SECUENCIA NO: 5)
H3	NPINYYGINYEGYVMDY (ID DE SECUENCIA NO:6)

La presente invención también se refiere a un anticuerpo que se une al mismo epítopo como un anticuerpo que tiene las CDRs descritas anteriormente. Los ensayos de inhibición competitiva se utilizan para representar los epítopos del antígeno. De esta forma también se provee un anticuerpo anti-MAG (alterado o no alterado) el cual competitivamente inhibe la unión del anticuerpo alterado que tiene las CDRs descritas *supra* a MAG, preferiblemente MAG humano.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un anticuerpo alterado o fragmento funcional del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una o más CDRs seleccionadas de CDRH1, CDRH2, y CDRH3, y/o un dominio variable de cadena ligera que comprende una o más CDRs seleccionadas de CDRL1, CDRL2, y CDRL3.

La invención además provee un anticuerpo anti-MAG alterado o fragmento funcional del mismo que comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende CDRH1, CDRH2, y CDRH3 en secuencia.

y/o

b) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende CDRL1, CDRL2, y CDRL3 en secuencia.

Un aspecto adicional de la invención provee una composición
5 farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG alterado de la presente invención o fragmento funcional del mismo junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto más, la presente invención provee un método
para el tratamiento o profilaxis de derrame cerebral y otras
10 enfermedades neurológicas en un ser humano, que comprende la administración a dicho ser humano en la necesidad del mismo, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MAG de la invención o fragmentos funcionales del mismo.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un
15 anticuerpo anti-MAG de la invención o un fragmento funcional del mismo en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de derrame cerebral y otras enfermedades neurológicas.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un
método para inhibir neurodegeneración y/o promover la recuperación
20 funcional en un paciente ser humano afectado con, o en riesgo de desarrollar, un derrame cerebral u otra enfermedad neurológica, que comprende la administración a dicho ser humano en la necesidad del mismo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MAG de la invención o un fragmento funcional del mismo.

25 En aún otro aspecto, la invención provee el uso de un

anticuerpo anti-MAG de la invención o un fragmento funcional del mismo en la preparación de un medicamento para inhibir neurodegeneración y/o promover la recuperación funcional en un paciente ser humano afectado con, o en riesgo de desarrollar, un
5 derrame cerebral y otras enfermedades neurológicas.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen además en la descripción detallada y las modalidades preferidas de la misma.

10

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Secuencia de una cadena pesada del anticuerpo anti-MAG quimérico de ratón/ser humano (SEC ID No: 27).

Figura 2: Secuencia de una cadena ligera del anticuerpo anti-
15 MAG quimérico de ratón/ser humano (SEC ID No: 28).

Figura 3: Secuencia de una cadena pesada del anticuerpo anti-MAG quimérico de ratón/ser humano (SEC ID No: 29).

Figura 4: El anticuerpo anti-MAG quimérico se une a MAG de rata.

20 Figura 5: Secuencias del anticuerpo anti-MAG humanizado.

Figura 6: Los anticuerpos anti-MAG humanizados se unen a MAG de rata.

Figura 7: Los anticuerpos anti-MAG humanizados se unen a MAG de rata.

25 Figura 8: Los anticuerpos anti-MAG humanizados se unen a

MAG de ser humano.

Figura 9: Competencia de ELISA con MAG de anticuerpos anti-MAG de ratón y humanizados.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Anticuerpo anti-MAG

El anticuerpo alterado de la invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal (mAb) y es preferiblemente quimérico,
10 humanizado o remodelado, de estos humanizados es particularmente preferido.

El anticuerpo alterado preferiblemente tiene la estructura de un anticuerpo natural o fragmento del mismo. El anticuerpo puede por lo tanto comprender un anticuerpo completo, un fragmento (Fab')₂, un
15 fragmento Fab, un dímero de cadena ligera o un dímero de cadena pesada. El anticuerpo puede ser un IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; o IgM; IgA, IgE o IgD o una variante modificada de los mismos. El dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo por consiguiente puede ser seleccionado Por consiguiente el dominio constante de la
20 cadena ligera puede ser un dominio constante kappa o lambda. Además, el anticuerpo puede comprender modificaciones de todas las clases de dímeros eg IgG, mutantes Fc que ya no se unen a receptores Fc o median la unión a Clq (anticuerpos de bloqueo). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico del tipo
25 descrito en WO86/01533 que comprende una región de unión a

antígeno y una región no de inmunoglobulina. La región de unión a antígeno es un anticuerpo de dominio variable de cadena ligera de o dominio variable de cadena pesada. Típicamente la región de unión a antígeno comprende ambos dominios variables, de cadena ligera y de cadena pesada. La región de no inmunoglobulina se fusiona en su término C a la región de unión de antígeno. La región de no inmunoglobulina es típicamente una proteína no de inmunoglobulina y puede ser una enzima, una toxina o proteína que tiene especificidad de unión conocida. Las dos regiones de este tipo de anticuerpo quimérico pueden estar conectadas a través de una secuencia enlazadora divisible. Las inmunoadhesinas que tienen las CDRs como se describió aquí anteriormente, también se contemplan en la presente invención.

La región constante se selecciona de acuerdo con la funcionalidad requerida. Normalmente un IgG1 demostrará la habilidad lítica a través de la unión que complementa y/o mediará ADCC (citotoxicidad de célula dependiente de anticuerpo. Un IgG4 será preferido si un anticuerpo de bloqueo no citotóxico es requerido. Sin embargo, los anticuerpos IgG4 pueden demostrar inestabilidad en la producción y por lo tanto será más preferible modificar el IgG1 generalmente más estable. Las modificaciones sugeridas se describen en las modificaciones preferidas EPO307434 incluidas en las posiciones 235 y 237. La invención por lo tanto proporciona una forma lítica o no lítica de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

En un aspecto preferido el anticuerpo preferido es clase IgG, más preferiblemente IgG1.

En formas preferidas por lo tanto, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que tiene los CDRs descritos *supra*. En las formas más preferidas se provee un anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que tiene las CDRs de SEC.I.D.NO.13 y 16 y un anticuerpo IgG1 no lítico de longitud completa que tiene las CDRs de SEC.ID.NO: 15 y 18.

En un aspecto adicional, la invención proporciona polinucleótidos que codifican CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL2 y CDRL3. Las secuencias de polinucleótido preferidas son

CDRs de cadena ligera

CDR	
L1	AAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTACAGCAGCAACCAGAAGAAGTA CCTGGCC (SECUENCIA ID NO: 7
L2	TGGGCCAGCACCCGCGAGAGC (SECUENCIA ID NO: 8
L3	CACCAGTACCTGAGCAGCCTGACC (SECUENCIA ID NO:9)

CDRs de cadena pesada

5

CDR	
H1	AACTACGGCATGACC (SECUENCIA ID NO: 10)
H2	TGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTAC (SECUENCIA ID NO: 11)
H3	AACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCTACGTGATGG ACTAC (SECUENCIA ID NO: 12)

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un
10 polinucleótido que codifica una región de cadena variable de un anticuerpo anti-MAG alterado incluyendo por lo menos una CDR seleccionada de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, más preferiblemente incluyendo las 3 CDRs en secuencia.

En un aspecto más de la invención, se proporciona un
15 polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-MAG alterado incluyendo por lo menos una CDR seleccionada de CDRH1, CDRH2, y CDRH3, más preferiblemente incluyendo las tres CDRs en secuencia.

En un aspecto particularmente preferido, el anticuerpo anti-
20 MAG de la invención es un anticuerpo humanizado.

La invención por consiguiente además proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento funcional del mismo que se une a y neutraliza MAG, el cual comprende una región variable de cadena pesada que comprende una de las siguientes secuencias de
25 aminoácido:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA
RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTLVTVSS (SEC ID No 13).

5 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCA
RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTLVTVSS (Secuencia ID No 14)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
10 MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCA
RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTLVTVSS (Secuencia ID No 15)

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un anticuerpo humanizado o fragmento funcional del mismo que se une
a MAG, el cual comprende la región variable de cadena pesada de la
15 Secuencia Id No 13, 14, o 15 junto con una región variable de
cadena ligera que comprende las Secuencias de aminoácido,
Secuencia Id No 16, 17, 18 o 19:

20 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCHQYLS
SLTFGQGGTKLEIKRTV (SEC ID No 16)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP
25 PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTINLQAEDVAVYYCHQYLS

SLTFGQGGTKLEIKRTV (SEC ID No 17)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLHTEDVAVYYCHHQYLS
SLTFGQGGTKLEIKRTV (SEC ID No 18)

5

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKKSSHSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP
PKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTIINLHTEDVAVYYCHHQYLS
SLTFGQGGTKLEIKRTV (SEC ID No 19)

10 En un aspecto adicional de la presente invención se provee un anticuerpo humanizado que comprende:

 un fragmento variable de cadena pesada que comprende SEC ID No 13, 14 o 15

 y una parte constante del fragmento del mismo de una cadena
15 pesada humana
 y

 un fragmento variable de cadena ligera que comprende SEC ID No. 16, 17, 18 o 19 y una parte constante o fragmento del mismo de una cadena ligera humana.

20 En un aspecto preferido, el anticuerpo humanizado es clase 1gG más preferiblemente 1gG1.

 Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden:

 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID

25 No 16;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 17;

5 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 18;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19;

10 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 16;

15 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 17;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 18;

20 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 16;

25 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID

No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 17;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID
5 No 18;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19.

En un aspecto adicional, la invención proporciona
10 polinucleótidos que codifican la región variable de cadena pesada que comprende las Secuencias ID Nos 13, 14 y 15 y las regiones variables de cadena ligera que comprenden la Secuencia ID No 16, 17, 18 y 19.

La Secuencia de polinucleótido preferida que codifica la
15 Secuencia de aminoácido SEC ID NO 13 es

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC
TCAGTGAFFTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTACG
GCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTGAGTGGATG
GGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCACGCGGAGGACTTC
20 ACGGGCCGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGGCATAT
CTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGT
GCGCAAACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGGCTACGTGA
TGGACTACTTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA (SEC ID
No 20)

La secuencia de polinucleótido preferida que codifica la Secuencia de aminoácido ID No 14 es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC
 CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCCTGGATACACCTTCACTAACT
 5 ACGGCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
 GATGGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGAAC
 GACTTCACGGCCGGTTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCRGTCAGCAGG
 GCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTAT
 TTCTGRGCGAGAAAACCCATCAACTACTACGGGCATCAACTACGAGGG
 10 CTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGGCACACTAGTCACAGTCTCCT
 CA (SEC ID No 21).

La secuencia de polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido ID No 15 es:

15 CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC
 CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGTTCTGGATACACCTTCACTAACTAC
 GGCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGAT
 GGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCCACCTACGCCGACGAC
 TTCACCGGCCCGGTTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGC
 20 ATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCACCTATTT
 CTGTGCGAGAAACCCCATCAACTACTACGGGCATCAACTACGAGGGCT
 ACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA
 (SEC ID No 22).

25 La secuencia de polinucleótido que codifica la Secuencia de

aminoácido ID No 16 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTGTA
CAGCAGCAACCAGAAGAACTACCTTGGCCTTGGTACCAGGCAGAAACC
 5 AGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTTGGGCATCTACCDGGGAA
TCCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATT
 TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATT
 ACTGTCACCAGACCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGC
 TGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID No 23).

10

La secuencia de polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido ID No 17 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGGCCACCATCAATCTGCAAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTAC
 15 AGCAGCAACCAGAAGAACTACCTTGGCCTTGGCCAAGCAGAAACCAG
 GACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTTGGGCATCTACCCGGGAATCC
 GGGGTCCCTGACCCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCATACCACCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTA
 CTGTCACCAGTAGCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAAGGGGACCAAG
 20 CTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID No 24)

El polinucleótido preferido que codifica SEC ID No 18 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGGCCACCATCAACTGAAAGAGCAGCCACAGCGTFCTGTACAG
 25 CAGCAACCAGAAGAACTACCTTGGCCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC

AGCCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGGCATCTACCGGGAATCCGG
 GGTCCCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTC
 TCACCATCAGCAGCCTGCACACCGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTC
ACCAGTACCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
 5 ATCAAACGTACGGTG (SEC ID No 25).

El polinucleótido preferido que codifica SEC ID No 19 es:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTAC
 10 AGCAGCAACCAGAAGAAGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAG
 GACAGCCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGGCATCTACCGGGAATC
CGGGGTCCCTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA
 CTCTCACCATCATCAACTGCACACCGAAGATGTGGCAGTTTATTACTG
TCACCAGTACCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG
 15 AGATCAAACGTAGGTG (SEC ID No 26).

"Neutralización" se refiere a la inhibición, ya sea total o parcial, de la función MAG incluyendo su unión a neuronas y la inhibición del desarrollo de neurita.

20 "Anticuerpo alterado" se refiere a una proteína codificada mediante una región de codificación de inmunoglobulina, la cual puede ser obtenida a través de la expresión en una célula huésped seleccionada. Dichos anticuerpos alterados incluyen anticuerpos diseñados (por ejemplo, quimérico, remodelado, humanizado o
 25 anticuerpos vectoreados) o fragmentos de anticuerpo que carecen de

toda o una parte de la región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, Fv, Fab, o F(ab)₂ y similares.

"Región que codifica la inmunoglobulina alterada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo alterado.

5 Cuando el anticuerpo alterado es un anticuerpo injertado o humanizado CDR, las secuencias que codifican las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de una inmunoglobulina no humana se insertan dentro de un primer patrón de inmunoglobulina que comprende secuencias de estructura variable
10 humanas. Opcionalmente, el primer patrón de Inmunoglobulina está operativamente enlazado a un segundo patrón de inmunoglobulina.

"Primer patrón de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una estructura humana o región variable de inmunoglobulina humana en la cual las regiones que
15 codifican CDR nativo (o de existencia natural) son reemplazadas por las regiones que codifican CDR de un anticuerpo donador. La región variable humana puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena ligera (o ambas cadenas), un análogo o fragmentos funcionales del mismo. Dichas regiones CDR, localizadas dentro de
20 la región variable de los anticuerpos (Inmunoglobulinas) pueden ser determinadas a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Kabat y otros (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, 4a. edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos, EUA, Institutos Nacionales de Salud (1987)) describe
25 reglas para localizar CDRs. Además, los programas de computadora

conocidos que son útiles para identificar regiones/estructuras CDR.

"Segundo patrón de Inmunoglobulina" se refiere a otra secuencia de nucleótido que codifica una proteína o péptido al cual el primer patrón de inmunoglobulina se fusiona en marco o a través de medios de una secuencia enlazadora convencional opcional (es decir, operativamente enlazada). Preferiblemente es un gen de inmunoglobulina. El segundo patrón de inmunoglobulina puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica la región constante completa para el mismo (es decir, homólogo – el primero y segundo anticuerpo alterado se derivan de la misma fuente) o un anticuerpo adicional (es decir, heterólogo) de interés. Puede ser una cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina (o ambas cadenas como parte de un polipéptido individual). El segundo patrón de inmunoglobulina no está limitado a una clase o isotipo de inmunoglobulina particular. Además, el segundo patrón de inmunoglobulina puede comprender parte de una región constante de inmunoglobulina, tal como la que se encuentra en Fab, o F(ab)₂ (es decir, una parte discreta de una región constante humana apropiada o región de estructura). Dicho segundo patrón de inmunoglobulina también puede comprender una secuencia que codifica una proteína de la membrana integral expuesta en su superficie externa a una célula huésped, por ejemplo, como parte de una colección de exhibición de fago, o una secuencia que codifica una proteína para detección analítica o de diagnóstico, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, etc.

Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o F(ab)₂ se utilizan con sus significados estándares (ver, por ejemplo, Harlow y otros, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Como se utiliza aquí, un "anticuerpo diseñado por ingeniería" describe un tipo de anticuerpo alterado, es decir, un anticuerpo sintético de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, remodelado o humanizado según opuesto a un fragmento del anticuerpo) en el cual una porción de los dominios variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor seleccionado son reemplazados por partes análogas de uno o más anticuerpos donadores que tiene especificidad para el epítopo seleccionado. Por ejemplo, dichas moléculas pueden incluir anticuerpos caracterizados por una cadena pesada humanizada asociada con una cadena ligera no modificada (o cadena ligera quimérica), o viceversa. Los anticuerpos diseñados por ingeniería a través de la alteración de las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones de estructura del dominio variable de cadena ligera y/o pesada con el fin de retener la especificidad de unión del anticuerpo donador. Estos anticuerpos pueden comprender el reemplazo de una o más CDRs (preferiblemente todas) del anticuerpo aceptor con CDRs de un anticuerpo donador descrito aquí.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo diseñado por ingeniería que contiene una región variable de existencia natural (cadena ligera y cadenas pesadas) derivadas de un anticuerpo donador en asociación con regiones constantes de

cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo diseñado por ingeniería que tiene sus CDRs derivados de una inmunoglobulina de donador no humano, las partes derivadas de 5 inmunoglobulina restantes de la molécula siendo derivadas de una (o más) inmunoglobulina(s) humanas. Además, los residuos de soporte de estructura pueden ser alterados para conservar la afinidad de unión (ver, por ejemplo, Queen y otros, Proc. Natl Acad Sci EUA, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson y otros, Bio/Technology, 9: 421 10 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, la base de datos Los Alamos, y la base de datos Swiss Protein, a través de homología a las secuencias de nucleótido y de aminoácido del anticuerpo donador. Un anticuerpo 15 humano caracterizado por una homología a las regiones de estructura del anticuerpo donador (o bases de aminoácido) pueden ser adecuadas para proveer una región constante de cadena pesada y/o región de estructura variable de cadena pesada para inserción de las CDRs del donador. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de 20 donar regiones de estructura constante de cadena ligera o variable puede ser seleccionado en una forma similar. Se deberá observar que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no son requeridas para originarse del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe varias formas para producir dichos anticuerpos 25 humanizados, ver, por ejemplo, EP-A-0239400 y EP-A-054951.

**"Anticuerpo humano remodelado" se refiere a un anticuerpo alterado en el cual en grado mínimo en por lo menos una CDR de un anticuerpo de donador monoclonal humano se substituye por una CDR en un segundo anticuerpo aceptor humano. Preferiblemente las
5 sels CDRs son reemplazadas. Más preferiblemente, una región de combinación del antígeno completo (por ejemplo, Fv, Fab, o F(ab)₂) de un primer anticuerpo monoclonal de donador humano es substituido por la región correspondiente en un segundo anticuerpo monoclonal aceptor humano. Más preferiblemente, la región Fab de
10 un primer donador humano está operativamente enlazada a las regiones constantes apropiadas de un segundo anticuerpo aceptor humano para formar un anticuerpo monoclonal de longitud completa.**

**Un "anticuerpo vectoreado" se refiere a un anticuerpo al cual se ha unido un agente para mejorar el transporte a través de la
15 barrera del cerebro sanguínea (BBB). (Revisar Pardridge; Advanced Drug Delivery Review 36, 299-321, 1999). El anexo puede ser química o alternativamente una porción que puede ser diseñada por ingeniería dentro del anticuerpo. Un ejemplo es hacer una quimera con un anticuerpo dirigido hacia un receptor eg, un anticuerpo del
20 receptor de anti-insulina o un anticuerpo del receptor anti-transferina de célula endotelial capilar del cerebro (Saito y otros, (1995) Proc. Natl. Acad Sci. EUS 92 10227-31; Pardridge y otros (1995) Pharm, Res 12 807-816; Broadwell y otros (1996) Exp. Neurol, 142 47-65; Bickel y otros (1993) Proc Natl. Acad Sci EUA 90, 2618-2622; Friden
25 y otros (1996) J. Pharm, Exp. Cher. 278 1491-1498, US5182107,**

US5154924, US5833988, US5527527). Una vez unido al receptor, ambos componentes del anticuerpo biespecífico pasan a través del BBB mediante el proceso de transcitosis. Alternativamente el agente puede ser un ligando el cual une dichos receptores de superficie de célula de eg insulina, transferina o lipoproteína de baja densidad (Descamps y otros (1996) Am. J. Physiol. 270 H1149-H1158 ; Duffy y otros (1987) Brain Res. 420 32-38; Dehouck y otros (1997) J. Cell Biol 1997 877-889). Los péptidos de existencia natural tales como penetratina y SynB1 y Syn B3 los cuales se sabe que mejoran el transporte a través de BBB también pueden ser utilizados (Rouselle y otros (2000) Mol. Pharr. 57,679-686 y Rouselle y otros (2001) Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 296, 124-131).

El término "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo (monoclonal, o recombinante) que contribuyan con las secuencias de aminoácido de sus regiones variables, CDRs, u otros fragmentos funcionales o análogos de las mismas a su primer patrón de inmunoglobulina, para así proveer la región de codificación de inmunoglobulina alterada y den como resultado un anticuerpo alterado expresado con su características de especificidad antigénica y actividad neutralizante del anticuerpo donador.

El término "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal, o recombinante) heterólogo al anticuerpo donador, que contribuye con toda la porción (o cualquier porción, pero preferiblemente toda) de las secuencias de aminoácido que codifican

sus regiones de estructura de cadena pesada y/o ligera o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera con el primer patrón de Inmunoglobulina. Preferiblemente un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

5 "CDRs" se define como las secuencias de aminoácido de la región que determina la complementaridad de un anticuerpo que es la región hipervariable de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Ver, por ejemplo, Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4a. Ed., U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987).
10 Existen tres CDRs de cadena pesada y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la porción variable de una inmunoglobulina. De esta forma, las "CDRs" como se utilizan aquí se refieren a las tres CDRs de cadena pesada, o a las tres CDRs de cadena ligera (o
15 ambas, todas las CDRs de cadena pesada y todas las CDRs de cadena ligera, si es apropiado). La estructura y el doblamiento de las proteínas del anticuerpo pueden significar que otros residuos son considerados parte de la región de unión del antígeno y se entendería esto a través de una persona con experiencia. Ver por
20 ejemplo Chothia y otros, (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, p877-883. Por conveniencia las CDRs según definidos por Kabat en SEC ID Nos 13-26 se subrayan.

Las CDRs proveen la mayoría de los residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítopo. Las CDRs de interés
25 en esta invención se derivan de las secuencias de cadena ligera o

cadena pesada variables del anticuerpo donador, e incluyen análogos de las CDRs de existencia natural, cuyos análogos también comparten o retienen la misma especificidad de unión a antígeno y/o habilidad neutralizante como el anticuerpo donador a partir del cual se derivan.

Un "fragmento funcional" es una secuencia variable de cadena pesada o cadena ligera (por ejemplo, eliminaciones menores en el término amino o carboxi de la región variable de Inmunoglobulina) que retienen la misma especificidad de unión a antígeno y/o habilidad neutralizante como el anticuerpo a partir del cual se deriva el fragmento.

Un "análogo" es una secuencia de aminoácido modificada a través de por lo menos un aminoácido, en donde dicha modificación pueden ser química o una sustitución o una reconfiguración de unos cuantos aminoácidos (es decir, no más de 10), cuya modificación permite a la secuencia de aminoácido retener las características biológicas, por ejemplo, especificidad de antígeno y alta afinidad, de la secuencia no modificada. Por ejemplo, se pueden construir mutaciones (silenciosas), a través de sustituciones, cuando ciertos sitios de restricción de endonucleasa se crean dentro o alrededor de las regiones que codifican CDR. La presente invención contempla el uso de análogos del anticuerpo de la invención. Se sabe bien que los cambios menores en las secuencias de aminoácido o de ácido nucleico pueden dirigir eg a una forma alélica de la proteína original que retiene substancialmente propiedades similares. De esta forma

los análogos del anticuerpo de la invención incluyen aquellos en donde las CDRs en la región hipervariable de cadenas pesada y ligera son por lo menos 80% homólogas, preferiblemente por lo menos 90% homólogas, y más preferiblemente por lo menos 95% homólogas a las CDRs según definido anteriormente como CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 y retienen la actividad neutralizante MAG. Las secuencias de aminoácido son por lo menos 80% homólogas si tienen 80% de residuos de aminoácido idénticos en una posición similar cuando las secuencias están alineadas óptimamente, los huecos o inserciones siendo contados como residuos no idénticos. La invención también contempla análogos de los anticuerpos de la invención en donde las regiones de estructura son por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 90% y de preferencia por lo menos 95% homólogas a las regiones de estructura establecidas en Sec ID 1-5. Las secuencias de aminoácido son por lo menos 80% homólogas si tienen 80% de residuos de aminoácido idénticos en una posición similar cuando las secuencias están alineadas óptimamente, y los huecos o inserciones son contados como residuos no idénticos.

Los análogos también pueden surgir como variaciones alélicas. Una "variación o modificación alélica" es una alteración en la secuencia de ácido nucleico. Dichas variaciones o modificaciones pueden ser debido a la degeneración en el código genético o pueden ser deliberadamente diseñadas por ingeniería para proveer características deseadas. Estas variaciones o modificaciones

pueden o no pueden dar como resultado alteraciones en cualquier secuencia de aminoácido codificada.

El término "agentes ejecutores" se refiere a moléculas portadoras no de proteína a la cuales los anticuerpos alterados, y/o
5 cadenas ligeras o pesadas naturales o sintéticas del anticuerpo donador u otros fragmentos del anticuerpo donador pueden estar asociadas a través de medios convencionales. Dichos portadores de no proteína pueden incluir portadores convencionales utilizados en el campo de diagnóstico, por ejemplo, poliestireno y otras perlas
10 plásticas, polisacáridos, por ejemplo, como se utilizan en el sistema BIAcore [Pharmacia], u otras sustancias no de proteína útiles en el campo médico y seguras en la administración a seres humanos y animales. Otros agentes ejecutores pueden incluir macrociclo, para la quelatación de un átomo de metal pesado, o radioisótopos. Dichos
15 agentes ejecutores también pueden ser útiles para incrementar la vida media de los anticuerpos alterados, por ejemplo, glicol polietilénico.

Un anticuerpo neutralizante específico para MAG ha sido descrito (Poltorak y otros (1987) Journal of Cell Biology 10S, 1893-
20 1899, DeBellard y otros (1996) Mol. Cell Neurosci 7, 89-101; Tang y otros (1997) Mol, Cell, Neurosci. 9, 333-346; Torigoe K y Lundborg G (1997) Exp.Neurology 150, 254-262) y está comercialmente disponible (MAB1567 (Chemicon)).

Alternativamente, se pueden construir anticuerpos y fragmento
25 inmunizando especies no humanas (por ejemplo, bovino, ovino,

mono, pollo, roedores (por ejemplo, murino y rata, etc.) para generar una inmunoglobulina deseable dependiendo de la presentación con MAG nativo de cualesquiera especies contra cuyos anticuerpos interaccionan con MAG humano pueden ser generados, eg humano o de pollo. Las técnicas de hibridoma convencionales se emplean para proveer una línea de células de hibridoma que secretan un mAB no humano para MAG. Dichos hibridomas después son clasificados para la unión utilizando MAG recubriendo placas de 384 y 96 cavidades, con MAG biotestado unido un placa recubierta con estreptavidina, o en un inmunoensayo enlazada a APC de europio homogéneo utilizando MAG biotestado.

Un anticuerpo humano nativo puede ser producido en un ratón de anticuerpo humano tal como el "Xenotón" (Abgenix) en donde los genes de inmunoglobulina del ratón han sido removidos y los genes que codifican la inmunoglobulina humana han sido insertados en el cromosoma del ratón. Los ratones se inmunizaron como normales y desarrollaron una respuesta a anticuerpo que se deriva de genes humanos. De esta forma el ratón produce anticuerpos humanos eliminando la necesidad de humanizarlos después de la selección de hibridomas positivos. (Ver Green L.L., J Immuno/Methods Dic 10 de 1999; 231 (1-2): 11-23).

La presente invención también incluye el uso de fragmentos Fab o fragmentos F(ab)₂ derivados de mAbs dirigidos contra MAG. Estos fragmentos son útiles como agentes protectores *in vivo*. Un fragmento Fab contiene la cadena ligera completa y una porción

terminal amino de la cadena pesada; y un fragmento $F(ab)_2$ es el
fragmento formado a través de dos fragmentos Fab unidos a enlaces
de disulfuro. Los fragmentos Fab y los fragmentos $F(ab)_2$ pueden ser
obtenidos a través de medios convencionales, por ejemplo, la
5 división de mAb con las enzimas proteolíticas, papaina y/o pepsina
apropiadas, o a través de métodos recombinantes. Los fragmentos
Fab y $F(ab)_2$ son útiles por ellos mismos como terapéuticos o
profilácticos, y como donadores de secuencias que incluyen las
regiones variables y secuencias CDR en la formación de anticuerpos
10 recombinantes o humanizados como se describe aquí.

Los fragmentos Fab y $F(ab)_2$ también pueden ser contruidos
a través de una colección de fago combinatoria (ver, por ejemplo,
Winter y otros Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)) o mezclando
la cadena de inmunoglobulina (ver, por ejemplo, Marks y otros,
15 Bio/Technology, 10: 779-783 (1992), las cuales ambas se incorporan
aquí por referencia en su totalidad.

De esta forma los fragmentos de anticuerpo humanos (Fv, scFv,
Fab) específicos para MAG pueden ser aislados utilizando
colecciones de exhibición de fago de fragmentos de anticuerpo
20 humanos. Una colección de partículas de bacteriófago, la cuales
exhiben las proteínas del fragmento de anticuerpo humano, se
mueven contra la proteína MAG. Esos fragmentos de anticuerpo que
exhiben fago que unen MAG se retienen de la colección y
clonalmente se amplifican. Los genes del anticuerpo humano
25 después se extraen del bacteriófago apropiado y se insertan en las

construcciones de expresión de IgG conteniendo las regiones constantes de IgG para formar la molécula IgG humana intacta con las regiones variables a partir del bacteriófago aislado específico para MAG.

- 5 Los anticuerpos de donador pueden aportar secuencias, tales como las secuencias de péptido de cadena pesada y/o cadena ligera, secuencias de estructura, secuencias CDR, fragmentos funcionales, y análogos de los mismos, y las secuencias de ácido nucleico que las codifican, útiles en el diseño y obtención de varios anticuerpos
- 10 alterados los cuales se caracterizan a través de la especificidad del antígeno del anticuerpo donador.

Tomando en cuenta la degeneración del código genético, varias secuencias de codificación pueden ser construidas, las cuales codifican las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena

15 ligera variables, y las secuencias CDR así como fragmentos funcionales y análogos de los mismos, que comparten la especificidad de antígeno del anticuerpo donador. Las secuencias de ácido nucleico, o fragmentos de las mismas, codifican las secuencias de péptido de cadena variable o las CDRs se pueden utilizar para

20 producir anticuerpos alterados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos o humanizados, u otros anticuerpos diseñados por ingeniería, cuando se combinan de manera operativa con un segundo patrón de Inmunoglobulina.

Las moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden codificar

25 anticuerpos alterados que incluyen anticuerpos diseñados por

ingeniería tales como los anticuerpos quiméricos y humanizados. Una región de inmunoglobulina alterada deseada contiene regiones de codificación CDR que codifican péptidos que tienen especificidad de antígeno de un anticuerpo anti-MAG, preferiblemente un anticuerpo de alta afinidad, insertado de un primer patrón de inmunoglobulina (una estructura humana o una región variable de inmunoglobulina humana).

Preferiblemente, el primer patrón de inmunoglobulina humano está operativamente enlazado a un segundo patrón de inmunoglobulina. El segundo patrón de inmunoglobulina se define anteriormente, y puede incluir una secuencia que codifica una segunda región de anticuerpo de interés, por ejemplo una región Fc. Los segundos patrones de inmunoglobulina también pueden incluir secuencias que codifican otra inmunoglobulina, a la cual otra región constante de cadena ligera o pesada está fusionada o a través de medios de una secuencia enlazadora. Los anticuerpos diseñados por ingeniería dirigidos contra fragmentos funcionales o análogos de MAG pueden ser diseñados para obtener una unión mejorada.

El segundo patrón de inmunoglobulina también puede estar asociado con los agentes ejecutores como se definió anteriormente, incluyendo moléculas portadoras no de proteína, a las cuales el segundo patrón de inmunoglobulina puede estar operativamente enlazado a través de medios convencionales.

La fusión o el enlace entre los segundos patrones de inmunoglobulina, por ejemplo, secuencias de anticuerpo, y el agente

ejecutor puede ser a través de cualesquiera medios adecuados, por ejemplo, a través de enlaces covalentes o iónicos, fusiones de proteínas, o enlazadores cruzados hetero-bifuncionales, por ejemplo, carbodiimida, glutaraldehído y similares. Dichas técnicas son conocidas en la técnica y fácilmente descritas en química convencional y textos de bioquímica.

Adicionalmente, las secuencias enlazadoras convencionales que simplemente proveen una cantidad deseada de espacio entre el segundo patrón de inmunoglobulina y el agente executor también pueden ser construidas en una región de codificación de inmunoglobulina alterada. El diseño de dichos enlazadores es bien conocido por aquellos con experiencia en la técnica. En aspectos adicionales de la invención, se proporcionan especies de proteína scFV de dos grupos (bivalentes o biespecíficas), de tres grupos, de cuatro grupos y otras multivalentes que tienen una o más CDRs como se describe *supra* que se unen a o neutralizan la función MAG.

En aún otra modalidad, el anticuerpo de la invención puede tener unido un agente adicional. Por ejemplo, el procedimiento de tecnología de ADN recombinante puede ser utilizado para producir un anticuerpo diseñado por ingeniería de la invención en el cual el fragmento Fc o el dominio CH2-CH3 de una molécula del anticuerpo completa ha sido reemplazada por una enzima u otra molécula detectable (es decir, un executor de polipéptido o molécula reportera).

El segundo patrón de inmunoglobulina también puede estar

operativamente enlazado a un péptido no de Inmunoglobulina, proteína o fragmento de la misma heterólogo a la secuencia que contiene la CDR que tiene especificidad de antígeno de un anticuerpo anti-MAG. La proteína resultante puede exhibir tanto
5 especificidad de antígeno anti-MAG como características de no inmunoglobulina dependiendo de la expresión. Las características del patrón de fusión pueden ser, por ejemplo, una característica funcional tal como otra unión o dominio del receptor, o una característica terapéutica si el patrón de fusión es por sí mismo una
10 proteína terapéutica, o características antigénicas adicionales.

Otra proteína deseable de esta invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa, que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa, o cualquier fragmento discreto del mismo, tales como los fragmentos Fab o F(ab')₂, un dímero de
15 cadena pesada o cualesquiera fragmentos recombinantes mínimos del mismo tal como un anticuerpo F_v o anticuerpo de cadena individual (SCA) o cualquier otra molécula con la misma especificidad que mAb de donador seleccionado. Dicha proteína puede ser utilizada en la forma de un anticuerpo alterado, o puede
20 ser utilizada en su forma no fusionada.

Siempre que el segundo patrón de Inmunoglobulina se derive de un anticuerpo diferente del anticuerpo donador, por ejemplo, cualquier isótopo o clase de estructura de inmunoglobulina o regiones constantes, resulta un anticuerpo diseñado por ingeniería.
25 Los anticuerpos diseñados por ingeniería pueden comprender

regiones constantes de Inmunoglobulina (Ig) y regiones de estructura variable de una fuente, por ejemplo, el anticuerpo aceptor, y una o más CDRs (preferiblemente todas) del anticuerpo donador. Además, las alteraciones, por ejemplo, eliminaciones, sustituciones, o adiciones, de la región de estructura del dominio ligero y/o variable mAb en el nivel de ácido nucleico y aminoácido o de las regiones CDR del donador pueden ser hechas con el fin de retener la especificidad de unión de antígeno del anticuerpo donador.

Dichos anticuerpos diseñados por ingeniería se diseñan para emplear una (o ambas) cadenas pesada y/o ligera variables de mAb anti-MAG o una o más CDRs de cadena ligera o pesada. Los anticuerpos diseñados por ingeniería pueden ser neutralizantes, como se definió anteriormente.

Dichos anticuerpos diseñados por ingeniería pueden incluir una anticuerpo humanizado que contiene las regiones de estructura de una inmunoglobulina o subtipo humano seleccionado, o un anticuerpo quimérico que contiene las regiones constantes de cadena pesada y ligera fusionadas con los fragmentos funcionales del anticuerpo anti-MAG. Un anticuerpo aceptor humano (u otro animal) adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, las base de datos Los Alamos, y la base de datos Swiss Protein, a través de homología con las secuencias de nucleótido y aminoácido del anticuerpo donador. Un anticuerpo humano características por una homología a la regiones de estructura del anticuerpo donador (sobre bases de aminoácido)

puede ser adecuado para proveer una región constante de cadena p
pesada y/o región de estructura variable de cadena pesada para la
inserción de las CDRs del donador. Un anticuerpo aceptor adecuado
capaz de donar regiones constantes o de estructura variable de
5 cadena ligera pueden seleccionarse en una forma similar. Se deberá
observar que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no
son requeridas para originarse del mismo anticuerpo aceptor.

Deseablemente las regiones de estructura heteróloga y
constantes se seleccionan de clases e isotipos de inmunoglobulina
10 humana, tales como IgG (subtipos 1 a 4), IgM IgA, e IgE. Sin
embargo, el anticuerpo aceptor necesita no comprender solamente
secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un
gen puede ser construido, en el cual una secuencia de ADN que
codifica parte de una cadena de inmunoglobulina humana se fusiona
15 con una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácido
no de inmunoglobulina tal como un ejecutor de polipéptido o
molécula reportera.

Preferiblemente, en un anticuerpo humanizado, los dominios
variables tanto en la cadena ligera como en la pesada han sido
20 diseñados por ingeniería a través de un o más reemplazos de CDR.
Es posible utilizar las seis CDRs, o varias combinaciones de menos
de seis CDRs. Preferiblemente se reemplazan las seis CDRs. Es
posible reemplazar las CDRs solamente en la cadena pesada
humana, utilizando como la cadena ligera la cadena ligera no
25 modificada del anticuerpo aceptor humano. Alternativamente, una

cadena ligera compatible puede ser seleccionada de otro anticuerpo humano a través de un recurso de la base de datos de anticuerpos convencional. El restante de los anticuerpos diseñados por ingeniería puede ser derivado de cualquier inmunoglobulina humana
5 derivada aceptora adecuada.

El anticuerpo humanizado diseñado por ingeniería de esta forma, preferiblemente tiene la estructura de un anticuerpo humano natural o un fragmento del mismo, y posee la combinación de las propiedades requeridas para un uso terapéutico efectivo.

10 Se entenderá por aquellos con experiencia en la técnica que un anticuerpo diseñado por ingeniería además puede ser modificado mediante cambios en los aminoácidos del dominio variable sin necesariamente afectar la especificidad y la alta afinidad del anticuerpo donador (es decir, análogo). Se anticipa que los
15 aminoácidos de cadena pesada y ligera pueden ser substituidos por otros aminoácidos ya sea en las estructuras del dominio variable o CDRs o ambas.

Además, la región constante puede ser alterada para mejorar o disminuir las propiedades selectivas de las moléculas de la presente
20 invención. Por ejemplo, dimerización, unión a receptores Fc, o la habilidad de unir y activar el complemento (Angal y otros, Mol. Immunol, 30: 105-108 (1993), Xu y otros, J. Biol. Chem, 269: 3469-3474 (1994), Winter y otros, EP 307,434-B).

Un anticuerpo alterado que es un anticuerpo quimérico difiere
25 de los anticuerpos humanizados descritos anteriormente al proveer la

regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo donador no humano completo, incluyendo la regiones de estructura, en asociación con regiones constantes de Inmunoglobulina de otras especies, preferiblemente humanas para ambas cadenas.

5 Preferiblemente, las secuencias de cadena ligera y/o pesada variable y las CRs de mAbs donares adecuados, y sus secuencias de ácido nucleico de codificación, se utilizan en la construcción de anticuerpos alterados, preferiblemente anticuerpos humanizados, de esta invención, a través del siguiente procedimiento. Se pueden
10 emplear las mismas técnicas o unas similares para generar otras modalidades de esta invención.

 Un hibridoma que produce un mAb donador seleccionado es convencionalmente clonado, y el ADN de estas regiones variables de cadena pesada y ligera obtenidas a través de técnicas conocidas por
15 aquellos expertos en el arte, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y otros, Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2a. edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)). Las regiones variables pesada y ligera que contienen por lo menos las regiones de codificación de CDR y aquellas porciones de las regiones de
20 estructura de dominio variables ligeras y/o pesadas de mAb aceptor requeridas con el fin de retener el carácter específico de unión de mAb donador, así como las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la cadena de anticuerpo derivada de una
25 inmunoglobulina humana se obtienen usando iniciadores de polinucleótido y transcriptasa inversa. Las regiones de codificación

de CDR se identifican usando una base de datos conocida y por comparación con otros anticuerpos.

Un anticuerpo quimérico de ratón/humano después puede ser preparado y analizado para habilidad de unión. Dicho anticuerpo
5 quimérico contiene todas las regiones del anticuerpo donador no humano V_H y V_L , en asociación con las regiones constantes Ig humanas para ambas cadenas.

Las regiones de estructura homólogas de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humano pueden ser identificadas
10 utilizando las bases de datos computarizadas, por ejemplo, KABAT , y un anticuerpo humano que tiene homología con el anticuerpo donador se seleccionarán como el anticuerpo aceptor. Una región de estructura variable de cadena ligera adecuada puede ser diseñada en una forma similar.

15 Un anticuerpo humanizado puede ser derivado del anticuerpo quimérico, o preferiblemente, hecho sintéticamente insertando las regiones de codificación CDR de mAb de las cadenas pesada y ligera apropiadamente dentro de la estructura de cadena pesada y ligera seleccionada. Alternativamente, un anticuerpo humanizado puede ser
20 hecho utilizando técnicas de mutagénesis estándares. De esta forma, el anticuerpo humanizado resultante contiene regiones de estructuras humanas y regiones de codificación CDR de mAb de donador.

Puede haber una manipulación subsiguiente de los residuos de
25 estructura. El anticuerpo humanizado resultante puede ser expresado

en células huésped recombinantes, por ejemplo, COS, CHO, y células de mieloma.

Un vector de expresión convencional o plásmido recombinante se produce colocando estas secuencias de codificación para el anticuerpo en asociación operativa con secuencias de control reguladoras convencionales capaces de controlar la replicación y expresión en, y/o la secreción de una célula huésped. Las secuencias reguladoras incluyen secuencias promotoras, por ejemplo, promotora CMV, y secuencias de señal, las cuales se pueden derivar de otros anticuerpos conocidos. Similarmente, un segundo vector de expresión puede ser producido teniendo una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera o pesada del anticuerpo complementaria. Preferiblemente este segundo vector de expresión es idéntico al primero excepto al grado en que las secuencias y marcadores seleccionables se refieren, para así asegurar tanto como sea posible que cada cadena de polipéptido sea funcionalmente expresada. Alternativamente, las cadenas pesada y ligera que codifican secuencias para el anticuerpo alterado pueden residir en un vector individual.

Una célula huésped seleccionada es co-transfectada a través de técnicas convencionales tanto con el primer como con el segundo vector (o simplemente transfectada a través de un vector individual) para crear la célula huésped transfectada de la invención que comprende tanto las cadenas ligera y pesada recombinantes o sintéticas. La célula transfectada entonces es cultivada a través de

técnicas convencionales para producir el anticuerpo diseñado por Ingeniería de la invención. El anticuerpo humanizado que incluye la asociación con ambas, la cadena pesada recombinante y/o la cadena ligera se clasifican a partir del cultivo a través de un ensayo
5 apropiado, tal como ELISA o RIA. Se pueden emplear técnicas convencionales similares para construir otros anticuerpos y moléculas alterados.

Los vectores adecuados para los pasos para la codificación y subclonación empleados en los métodos y la construcción de las
10 composiciones de esta invención pueden seleccionarse a través de alguien con experiencia en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar las series pUC convencionales de vectores de clonación. Un vector, pUC19, está comercialmente disponible de casas de suministros, tales como Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido) o
15 Pharmacia (Uppsala, Suecia). Adicionalmente, cualquier vector que es capaz de fácilmente replicar, tiene una abundancia de sitios de clonación y genes seleccionables (por ejemplo, resistencia a antibiótico), y es fácilmente manipulado puede ser utilizado para la clonación. De esta forma, la selección del vector de clonación no es
20 una limitante en esta invención.

Similarmente, los vectores empleados para la expresión de los anticuerpos pueden seleccionarse por alguien con experiencia en la técnica de cualquier vector convencional. Los vectores también contienen secuencias reguladoras seleccionadas (tales como
25 promotores CMV) que dirigen la replicación y la expresión de las

secuencias de ADN heterólogas en células huésped seleccionadas. Estos vectores contienen las secuencias de ADN anteriormente descritas que codifican el anticuerpo o región de codificación de inmunoglobulina alterada. Además, los vectores pueden incorporar
5 las secuencias de inmunoglobulina seleccionadas modificadas a través de la inserción de los sitios de restricción para una fácil manipulación.

Los vectores de expresión también pueden ser caracterizados a través de genes adecuados para la expresión de amplificación de las
10 secuencias de ADN heterólogas, por ejemplo, el gen de reductasa de dihidrofolato de mamífero (DHFR). Otras secuencias de vector preferibles incluyen una secuencia de señal poli A, tal como de hormona del crecimiento de bovino (BGH) y la secuencia promotora de betaglobina (betaglopro). Los vectores de expresión útiles aquí
15 pueden ser sintetizados a través de técnicas bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica.

Los componentes de dichos vectores, por ejemplo, replicones, genes de selección mejoradores, promotores, secuencias de señal y similares, pueden ser obtenidos de fuentes comerciales o naturales o
20 sintetizados a través de procedimientos para uso en la dirección de la expresión y/o secreción del producto del ADN recombinante en una célula huésped. Otros vectores de expresión apropiados de los cuales se conocen muchos tipos en la técnica para las expresión de mamíferos, bacterial, de insectos, de levadura y fúngicos también se
25 pueden seleccionar para este propósito.

La presente invención también abarca una línea de células transfectada con un plásmido recombinante que contiene las secuencias de codificación de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina alteradas de los mismos. Las células huésped útiles
5 para la clonación y otras manipulaciones de estos vectores de expresión también son convencionales. Sin embargo, más deseable, son las células de varias cepas de *E. coli* que se utilizan para la replicación de los vectores de expresión y otros pasos en la construcción de anticuerpos alterados de esta invención.

10 Las células huésped o líneas de célula adecuadas para la expresión del anticuerpo de la invención son preferiblemente células de mamífero tales como NS0, Sp2/0, CHO, COS, una célula de fibroblasto (por ejemplo, 3T3) y células de mieloma, y más preferiblemente una célula CHO o de mieloma. Las células de seres
15 humanos pueden ser utilizadas, de esta forma se habilita la molécula que va a ser modificada con patrones de glicosilación humanos. Alternativamente, se pueden emplear otras células eucarióticas. La selección de células huésped de mamífero y métodos para la transformación, cultivo, amplificación, clasificación y producción y
20 purificación del producto son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, citado anteriormente.

Las células bacterianas pueden probar que son útiles como células huésped adecuadas para la expresión de Fabs recombinantes de la presente invención (ver, por ejemplo, Pluckthun, A., Immunol.
25 Rev., 130: 151-188 (1992)). Sin embargo, debido a la tendencia de

las proteínas expresadas en células bacterianas de estar en una forma no plegada o inapropiadamente plegada, o en una forma no glicosilada, cualquier Fab recombinante producido en una célula bacteriana tendrá que ser clasificada para la retención de la habilidad de unión a antígeno. Si la molécula expresada a través de la célula bacteriana fue producida en una forma plegada apropiada, esa célula bacteriana sería un huésped adecuado. Por ejemplo, varias cepas de *E.coli* utilizadas para la expresión son bien conocidas como células huésped en el campo de la biotecnología.

10 Varlas cepas de *B. subtilis*, *Streptomyces*, otros bacilos y similares también pueden emplearse en este método.

Quando las cepas, deseadas de células de levadura conocidas por aquellos con experiencia en la técnica también están disponibles como células huésped, así como células de insecto, por ejemplo, *Drosophila* y *Lepidoptera* y sistemas de expresión viral. Ver, por ejemplo, Miller y otros, Genetic Engineering, 8: 277-298, Plenum Press (1986) y referencias citadas ahí.

15

Los métodos generales a través de los cuales los vectores pueden ser contruidos, los métodos de transfección requeridos para producir las células huésped de la invención, y los métodos de cultivo necesarios para producir el anticuerpo alterado de la invención de dicha célula huésped son todos técnicas convencionales. Igualmente, una vez producidos, los anticuerpos de la invención pueden ser purificados a partir del contenido del cultivo de células de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica,

20

25

incluyendo precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, electroforesis de gel y similares. Dichas técnicas están dentro de la experiencia de la técnica y no limitan esta invención. Por ejemplo, la preparación de anticuerpos alterados
5 se describe en WO 99/58679 y WO 98/16990.

Aún otro método para la expresión de los anticuerpos puede utilizar la expresión en un animal transgénico, tal como se describe en la patente de E.U.A. No. 4,873,316. Esta se refiere a un sistema de expresión utilizando el promotor de caseína del animal el cual
10 cuando transgénicamente se incorpora dentro de un mamífero permite que la hembra produzca la proteína recombinante deseada en su leche.

Una vez expresado a través del método deseado, el anticuerpo entonces es examinado para la actividad *in vitro* a través del uso de
15 un ensayo apropiado. Los formatos del ensayo ELISA convencional actualmente se emplean para evaluar cualitativa y cuantitativamente la unión del anticuerpo a MAG. Adicionalmente, también se pueden utilizar otros ensayos *in vitro* para verificar la eficacia de la neutralización antes de que se realicen los estudios clínicos
20 humanos subsiguientes para evaluar la persistencia del anticuerpo en el cuerpo a pesar de los mecanismos de eliminación usuales.

Los agentes terapéuticos de esta invención pueden ser administrados como un profiláctico o después del daño, o por el contrario según sea necesario. La dosis y la duración del tratamiento
25 se refieren a la duración relativa de las moléculas de la presente

invención en la circulación del ser humano, y pueden ser ajustadas por uno con experiencia en la técnica dependiendo de la condición que se está tratando y la salud general del paciente.

El modo de administración del agente terapéutico de la invención puede ser cualquier ruta adecuada que suministra el agente al huésped. Los antagonistas y anticuerpos, y las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, o intranasalmente.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden ser preparados como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad efectiva del antagonista o anticuerpo de la invención como un ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. En el agente profiláctico de la invención, una suspensión o solución acuosa que contiene el anticuerpo diseñado por ingeniería, preferiblemente simplificado a un pH fisiológico, en una forma lista para inyección se prefiere. Las composiciones para administración parenteral comúnmente comprenderán una solución del antagonista o anticuerpo de la invención o un cóctel del mismo disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un portador acuoso. Se puede emplear una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, 0.9% de salina, 0.3% de glicina, y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia de partículas. Estas soluciones pueden ser esterilizadas a través de técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales (por

ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según requeridas para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como ajustando el pH, y agentes reguladores de pH, etc. La concentración del antagonista o anticuerpo de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, de menos de alrededor del 0.5%, usualmente al o por lo menos alrededor del 0.1% a cuando mucho el 15 o 20% en peso y se seleccionará principalmente con base en los volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

De esta forma, una composición farmacéutica de la invención para inyección intramuscular podría ser preparada para contener 1 ml de agua regulada en su pH estéril, y de entre aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg, por ejemplo alrededor de 50 ng a aproximadamente 30 mg o más preferiblemente, de alrededor de 5 g a aproximadamente 25 mg, de un antagonista o anticuerpo de la invención. Similarmente, una composición farmacéutica de la invención para infusión intravenosa podría estar hecha para contener alrededor de 250 ml de solución Ringer estéril, y alrededor de 1 a aproximadamente 30 y preferiblemente 5 mg a alrededor de 25 mg de un anticuerpo diseñado por ingeniería de la invención. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente son bien conocidas o pueden ser preparadas por aquellos con experiencia en la técnica y se describen con más

detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15^{ava} ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Se prefiere que el agente terapéutico de la invención, cuando está en una preparación farmacéutica, esté presente en formas de dosis unitarias. La dosis terapéuticamente efectiva apropiada puede ser determinada fácilmente por aquellos con experiencia en la técnica. Para efectivamente tratar derrame cerebral y enfermedades neurológicas en un ser humano, una dosis de hasta 700 mg por 70 kg del cuerpo de un antagonista o anticuerpo de esta invención deberá ser administrada parenteralmente, *i.v.* o *i.m.* (intramuscularmente). Dicha dosis puede, si es necesario, repetirse a intervalos de tiempo apropiados seleccionados según sea apropiado por el médico.

Los anticuerpos descritos aquí pueden ser liofilizados para almacenamiento y reconstituidos en un portador adecuado antes de uso. Esta técnica ha demostrado ser efectiva con inmunoglobulinas convencionales y las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica pueden ser empleadas.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG de la presente invención o un fragmento funcional del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento o profilaxis de derrame cerebral y otras enfermedades neurológicas.

En aún otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-MAG de la presente invención o un fragmento funcional del mismo y un portador

farmacéuticamente aceptable para inhibir la neurodegeneración y/o promover la recuperación funcional en un paciente ser humano que sufre, o está en riesgo de desarrollar, un derrame cerebral u otra enfermedad neurológica.

5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO 1

Anticuerpo anti-MAG en un modelo de derrame cerebral

10 Materiales y Métodos

Anticuerpo monoclonal anti-MAG

El anticuerpo monoclonal anti-MAG fue un MAB de anticuerpo MAG anti-pollo de ratón 1587 obtenido de Chemicon. El anticuerpo tiene las siguientes características:

15 Antígeno: glicoproteína asociada con mielina (humana, de ratón, de rata, de bovino, de pollo, de rana).

Isotipo: IgG1

Habilidad neutralizante: ver DeBellard y otros (1996) Mol. Cell. Neurosci. 7, 89-101; Tang y otros (1997) Mol. Cell Neurosci 9, 333-
20 346 ; Torlgoe K y Lundborg G (1997) Exp. Neurology 150, 254-262.

El mab IgG de control se compró en R+D Systems.

Insertión de cánula intra-cerebral ventricular (solamente para el estudio 1)

25 Bajo anestesia de halotén se colocó una cánula intra-cerebral

ok

ventricular (i.c.v.) en el ventrículo cerebral lateral izquierdo (coordenadas: 1.6 mm de la línea media, 0.8 mm del caudal del vértice, 4.1 mm de la superficie del cráneo, barra del diente incisivo – 3.2 mm por debajo de cero de acuerdo con Paxinos y Watson, 1986). Todas las ratas fueron alojadas individualmente para evitar el daño a la guía o cánula sustituta. Siete días después de la cirugía, la colocación correcta de la cánula se verificó a través de una respuesta para beber intensa a Angiotensina II (100 ng, Simpson y otros, 1978). Nueve días después, los animales experimentaron isquemia cerebral.

Isquemia Cerebral Focal Temporal

Se indujo isquemia cerebral focal temporal (90 minutos) en ratas Sprague Dawley macho, cada una pesando entre 300-350 g. Los animales fueron inicialmente anestesiados con una mezcla de 5% de halotén, 60% de óxido nitroso y 30% de oxígeno, colocada en una máscara facial y la anestesia subsecuentemente se mantuvo a 1.5% de halotén. La oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se llevó a cabo utilizando la técnica del hilo iluminado como se describió previamente (Zea Longa y otros, 1989). Los animales se mantuvieron a temperatura normal a lo largo del procedimiento quirúrgico, se les dejó recuperar durante 1 hora en un incubador, antes de ser alojados individualmente. Solamente aquellos animales con una puntuación neurológica de 3, 1 hora después de la oclusión se incluyeron en el estudio (según evaluado utilizando un sistema de puntuación de 5

puntos: 0, no déficit; 1, reflejo contralateral; 2, agarre debilitado; 3, circulando; 4, inmóvil, 5, muerto). Los animales se mantuvieron hasta 1 semana tiempo después del cual se aniquillaron a través de perfusión transcardiaca de 0.9% de salina seguido por 4% de paraformaldehído en 100 mM de regulador de pH de fosfato. Los cerebros se post-fijaron en 4% de paraformaldehído a 4°C momento en el cual se removieron de los cráneos y se cortaron en bloques de 2 mm utilizando un procesador de tejido Shandon Citadel 1000, se cortaron en secciones de 6 µm utilizando un bisturí y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Las secciones después se procesaron con tinción Cresyl Fast Violet (CFV).

Régimen de dosis

El anticuerpo monoclonal anti-MAG y el anticuerpo de control del isotipo IgG1 se dializaron contra cloruro de sodio al 0.9% estéril durante la noche, y se concentraron apropiadamente.

Estudio 1: Los animales recibieron 2.5 µg de anti-MAGmab o 2.5 µg de IgG de ratón i.c.v., 1, 24 y 72 horas después de MCAO (5 ul por dosis).

Estudio 2: Los animales recibieron 200 µg de mab anti-MAG o 200 µg de IgG de ratón i.v., 1 y 24 horas después de MCAO.

El investigador fue incapaz de ver la identidad de cada solución de dosificación.

Análisis Neurológico

Antes de la inducción de isquemia cerebral, las ratas para el Estudio 1 recibieron entrenamiento en para caminar en la viga y la prueba de la etiqueta pegajosa. Los animales que no lograron el criterio en ambas pruebas fueron excluidas del estudio adicional. Después del entrenamiento, el resto de los animales fueron estratificados de acuerdo con el rendimiento en dos grupos balanceados. A lo largo del análisis neurológico, los investigadores fueron incapaces de ver el grupo de tratamiento del animal.

10

Prueba de la etiqueta Pegajosa Bilateral

La prueba de la etiqueta pegajosa bilateral (Schallert y otros, Pharmacology Biochemistry and Behaviour 16: 455-462, (1983)) se utilizó para evaluar negligencia contralateral/tendencia ipsilateral. Esto modela la extinción táctil observada en pacientes con derrame cerebral (Rose y otros, 1994). Esta prueba ha sido descrita en detalle previamente (Hunter, y otros, Neuropharmacology 39: 806-816 (2000); Virley y otros Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 20: 563-582 (2000)). Brevemente, una etiqueta de papel pegajosa, redonda se colocó firmemente alrededor del área sin pelo de las patas delanteras con una igual presión con el fin de colocarla aleatoriamente (izquierda, derecha). Las sesiones de entrenamiento fueron conducidas durante 6 días antes de MCAO, los datos del día 6 se utilizaron como la línea de base pre-operativa (Día 0). Se les dieron a los animales evaluaciones 24 y 7 días después de MCAO,

los datos representan una media para las dos evaluaciones. La latencia para contactar y remover las etiquetas se registró y se analizó utilizando la prueba logrank (Cox, J. Royal Statistical Society B 34: 187-220 (1972)).

5

Moverse a lo largo de la viga

Moverse a lo largo de la viga se utilizó como una medida de coordinación de la pata delantera y la pata trasera a través de medios de distancia viajada a través de una viga elevada a 100 cm (2.3 cm de diámetro, 48 cm del piso) como se describió previamente en detalle (Virley y otros, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 20: 563-582 (2000)). Las ratas se entrenaron para cruzar la viga desde el inicio hasta el fin. A partir de las pruebas, cada a cada rata se le hicieron dos evaluaciones a 24 horas y 7 días después de MCAO, los datos representan una media de las dos evaluaciones. El análisis estadístico fue ANOVA seguido por la prueba t de Student.

La puntuación neurológica de 27 puntos (Estudio-1)

Este estudio consiste de una batería de pruebas para evaluar el estado neurológico incluyendo, colocación de la pata, alcanzar la pata trasera visual, barra horizontal, rotación contra lateral, plano inclinado, reflejo corregido, reflejo contra lateral, motilidad y condición general, como se describió previamente (Hunter, y otros, Neuropharmacology 39: 806- 816 (2000)) con la adición de

mediciones de la resistencia al agarre (puntuaciones de 2 para un agarre de la pata trasera derecha bueno, 1 para el agarra débil). Puntuación total= 27 para un animal normal.

Para el estudio 2 esta prueba se modificó adicionalmente:

- 5 Resistencia de agarre – puntuaciones normales 3, bueno – 2, débil – 1, muy débil – 0; Motilidad – puntuaciones normales 4, excelente – 3, muy bueno – 2, bueno – 1, promedio – 0; Condición general: puntuaciones normales 4, excelente – 3, muy buena – 2, buena -1, promedio – 0; Girando – ninguna puntuación 5, puntuaciones de un
10 lado a favor 4, círculo grande – 3, círculo medio -2, círculo pequeño -1, girando – 0). Puntuación total = 32 para un animal normal.

En ambos estudios los animales se probaron 1, 24, 48 horas y 7 días después de MCAO, un animal con salud normal tuvo una puntuación de 27 o 32 respectivamente. Los datos se presentan
15 como valores medios, el análisis estadístico fue Kruskal Wallis ANOVA.

Evaluación de lesión

Estudio 1- Para cada animal, las áreas de la lesión fueron
20 evaluadas en secciones de tres niveles predeterminados en el cerebro (0, -2.0 y -6.0 mm desde el vértice respectivamente). El daño neuronal se evaluó utilizando tinción cresyl fast violet y el área del daño se midió utilizando el paquete formador de imágenes Optimas 6.1. Los datos se expresaron como el área media (mm^2) $\pm$ sem.

25 Estudio 2 – Para cada animal, las áreas de la lesión se

evaluaron en secciones de siete niveles predeterminados en el cerebro (+3 mm, a -8 mm w.r.t. vértice). El daño neuronal se evaluó utilizando tinción cresyl fast violet y el área del daño se midió utilizando el paquete formador de imágenes Optimas 6.1. Los datos se expresaron como el área media (mm^2) $\pm$ sem.

Resultados

Estudio 1 – Administración ventricular Intra-cerebral (I.c.v.) de mab anti-MAG

10 Puntuación neurológica

Una hora después de MCAO los animales en ambos grupos del tratamiento mostraron un deterioro marcado en la puntuación neurológica (puntuación media 12 en cada grupo). No hubo una diferencia significativa entre los grupos en este momento. Sin embargo, 24 ($p=0.02$), 48 ($p=0.005$) horas y 7 días ($p=0.006$) después de MCAO los animales tratados con mab anti-MAG (2.5 μg , 1, 24 y 72 horas después de MCAO) mostraron una puntuación Neurológica Total significativamente mejorada comparada con aquellos tratados con IgG de control. Las puntuaciones neurológicas medias 24, 48 horas y 7 días después de MCAO en el grupo tratado con IgG, fueron 15, 14, y 18 respectivamente comparado con 19.5, 21.5 y 22 en los animales tratados con mab anti-MAG. En un análisis adicional de los comportamientos individuales que comprende la puntuación total, este significativo mejoramiento fue principalmente atribuido al rendimiento mejorado en las siguientes pruebas:

colocación de la pata (24 horas, $p=0.045$; 48 horas, $p=0.016$; 7 días, $p=0.008$), resistencia del agarre (24 horas, $p=0.049$; 48 horas, $p=0.0495$; 7 días, $p=0.243$), motilidad (24 horas, $p=0.199$; 48 horas, $p=0.012$; 7 días, $p=0.067$), barra horizontal (24 horas, $p=0.065$; 48 horas, $p=0.005$; 7 días, $p=0.016$), plano inclinado (24 horas, $p=0.006$; 48 horas, $p=0.006$; 7 días, $p=0.169$), alcanzar la pata trasera visual (48 horas, $p=0.049$; 7 días, $p=0.008$) y el grado de giro (24 horas, $p=0.417$; 48 horas, $p=0.034$; 7 días, $p=0.183$).

10 *Caminar sobre la viga*

Antes de la cirugía todos los animales se entrenaron para cruzar la viga (100 cm). Veinticuatro horas después de la cirugía hubo un significativo deterioro en la distancia viajada en la viga tanto en los animales tratados con anti-MAG (50 ± 18 cm) como con IgG₁ (22 ± 14 cm) comparado con los valores pre-operativos. Aunque no fue importante, los animales tratados con anti-MAG mostraron un mejoramiento marcado sobre los animales tratados con IgG₁, en que éstos viajaron el doble de la distancia de los animales tratados con IgG₁ 24 horas después de tMCAO. Siete días después de la cirugía sin embargo, mientras ambos grupos mostraron un mejoramiento marcado durante el tiempo, el rendimiento de los animales tratados con IgG permaneció significativamente deteriorado comparado con la línea de base (55 ± 15 cm; $p=0.005$). En contraste sin embargo, 7 días después de MCAO, los animales tratados con mab anti-MAG (25 μ g 1, 24 y 72 horas. i.c.v. después de MCAO) el rendimiento no fue

significativamente diferente de la línea de base (75 ± 15 cm; $p=0.07$). Estos datos muestran que tratamiento mab anti-MAG acelera la recuperación de esta tarea de caminar en la viga comparado con controles tratados con IgG₁ de ratón.

5

Etiqueta pegajosa

Antes de la cirugía, los animales en cada uno de los grupos de tratamiento fácilmente contactaron y removieron las etiquetas de cada pata trasera, no hubo una diferencia importante en los grupos antes del tratamiento (Cuadro 1). Veinticuatro horas y 7 días después de MCAO la latencia para contactar la pata izquierda en cada uno de los grupos de tratamiento permaneció relativamente sin alteraciones, mientras que aquel de la derecha fue marcadamente incrementado. Sin embargo no hubo diferencias importantes entre los tiempos de remoción en los animales tratados con anti-MAG e IgG₁. Además, 24 horas después de MCAO, la latencia para la remoción de tanto la pata trasera izquierda como de la derecha se incremento significativamente en ambos grupos del tratamiento comparado con la línea de base, sin embargo en los animales tratados con anti-MAG la latencia para la remoción de la pata trasera fue significativamente más corta que aquella de los animales tratados con IgG₁ ($p=0.03$). También hubo una tendencia hacia la latencia reducida para la remoción de la pata trasera en animales tratados con anti-MAG comparado con aquellos tratados con IgG₁ ($p=0.08$ (Cuadro 1). A 7 días hubo algún grado de recuperación en los animales tratados con

IgG₁ en que la latencia a los tiempos de la remoción para cada pata trasera fue reducida comparada con aquellos a las 24 horas (Cuadro 1). Estos datos sugieren que el tratamiento de ratas con mab anti-MAG acelera la recuperación en esta prueba de la etiqueta pegajosa después de tMCAO.

CUADRO 1
Datos de la etiqueta pegajosa

Día	Tratamiento	Tiempo(s) de contacto (Media±sem)		Tiempo(s) de la remoción (Media±sem)	
		Pata trasera izquierda	Pata trasera derecha	Pata trasera izquierda	Pata trasera derecha
0	Anti-MAG	2.4 ± 0.2	3.6 ± 0.5	12 ± 2	12 ± 2
0	IgG ₁	3.6 ± 0.6	4.2 ± 0.7	10 ± 1	9 ± 1
1	Anti-MAG	5.9 ± 3.7	109.6 ± 27.5	*61 ± 26	96 ± 26
1	IgG ₁	3.6 ± 0.5	71.8 ± 31.7	130 ± 21	156 ± 19
7	Anti-MAG	3.8 ± 1	36.4 ± 10.2	54 ± 23	80 ± 30
7	IgG ₁	2.8 ± 0.2	64 ± 28	23 ± 8	87 ± 20

(*P=0.03 anti-MAG vs IgG₁ utilizando la prueba de logrank)

Mediciones del área del daño

La administración de mab anti-MAG i.v.x. significativamente reduce el área de la lesión en dos de los tres niveles del cerebro examinados comparados con aquellos animales tratados con cantidades iguales de IgG₁ de ratón, cuando se examinaron 7 días después de tMCAO (Cuadro 2).

85

CUADR 2

5

	Área de la lesión media ± sem (mm²) 7 días después de tMCAO		
Tratamiento	Vértice 0 mm wrt	Vértice -2 mm wrt	Vértice -6 mm wrt
mab Anti-MAG (n=8)	*9 ± 2	*4 ± 3	*3 ± 1
IgG ₁ de ratón (n=9)	14 ± 1	12 ± 1	5 ± 1

(*p=0.02, *p=0.03, *p=0.06, anti-MAG contra IgG₁, Una dirección, Prueba t de Students no deteriorada.

10

Estudio 2. Administración Intravenosa (i.v.)

Puntuación neurológica

Una y 24 hora después de MCAO los animales en ambos grupos mostraron un deterioro marcado en la puntuación neurológica. No
15 hubo una diferencia significativa entre los grupos en este momento, las puntuaciones medias 24 horas después del tratamiento mab anti-MAG e IgG₁ fueron de 20 y 18 respectivamente (p=0.5). Cuarenta y ocho horas después de MCAO, los animales se trataron con mab anti-MAG (200 ug, i.v., 1 y 24 horas después de MCAO) mostraron un
20 mejoramiento significativo en la colocación de la pata (p=0.048) y la resistencia del agarre (p=0.033). Siete días después del comienzo de la isquemia cerebral los animales tratados con mab anti-MAG continuaron mejorando (colocación de pata p=0.041; resistencia de agarre, p=0.048; motilidad, p=0.05) y mostraron un mejoramiento
25 significativo en la puntuación neurológica total (puntuación media

82

25) comparada con aquellos tratados con IgG₁ de ratón (puntuación media 23, p=0.047).

Mediciones del área de la lesión

5 El anticuerpo anti-MAG cuando se administró MCAO i.v. significativamente redujo el área de la lesión en 5 de 7 niveles de cerebro predeterminados (+3 a -8 mm w.r.t. Vértice) comparado con los controles de isotipo, cuando se examinaron 7 días después de MCAO.

10

Vértice wrt del nivel del cerebro	Área de la lesión media ± SEM (mm²)- tratada con Anti-MAG	Área de la lesión media ± SEM (mm²)- tratada con IgG ₁ de ratón
3 mm	*0.38 ± 0.271	1.77 ± 0.45
1 mm	*5.82 ± 1.65	9.627 ± 1.14
-1 mm	8.98 ± 2.58	12.07 ± 1.57
-2 mm	7.28 ± 1.92	10.04 ± 1.39
-4 mm	*5.57 ± 1.06	10.38 ± 1.39
-6 mm	*1.36 ± 0.27	4.43 ± 1.95
-8 mm	*0.27 ± 0.27	1.93 ± 0.56

15

20

*p<0.05 – Prueba t de Students una dirección, no deteriorada.

Conclusiones

Un anticuerpo monoclonal anti-MAG administrado ya sea directamente dentro de CSF o intravenosamente después de la 25 oclusión de la arteria cerebral media temporal en la rata, ambas

8x

reducen el área de la muerte de célula y mejoran la recuperación funcional comparado con animales de control tratados. El grado de neuroprotección visto en estos estudios sugiere que este efecto no puede ser atribuido al desarrollo de axones ya que esto no daría

5 resultado en el ahorro de neuronas. El mejoramiento en la recuperación funcional visto 24 y 48 horas después de MCAO probablemente refleja el grado de neuroprotección ofrecido por este anticuerpo comparado con los animales de control tratados. Sin embargo, a través del tiempo los animales parecen mejorar además,

10 sugiriendo que el bloqueo de la actividad MAG también puede mejorar la recuperación funcional a través del tiempo.

Los estudios presentados aquí proporcionan evidencia de que al bloquear las acciones de MAG se provee tanto neuroprotección como recuperación funcional mejorada en un modelo de rata de

15 derrame cerebral, y por consiguiente los anticuerpos anti-MAG proveen agentes terapéuticos potenciales para neuroprotección aguda y/o la promoción de recuperación funcional después del derrame cerebral. Las cantidades bajas de anticuerpo administradas a través de la ruta i.v. y los niveles de suero bajos resultantes del

20 anticuerpo sugerirían concentraciones de anticuerpo extremadamente bajas en el cerebro debido a las limitantes de la barrera del cerebro sanguínea para la penetración del anticuerpo. Sorprendentemente, sin embargo, esto aún resulta en ambos, la neuroprotección y la recuperación funcional mejorada que se observan. Los anticuerpos

25 anti-MAG también tienen un uso potencial en el tratamiento de otros

92

trastornos neurológicos en donde la degeneración de las células y/o fibras de nervio es aparente, tales como daño en la espina dorsal, daño en el cerebro traumático, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, demencias fronto-temporales (tauopatías), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y Esclerosis Múltiple. En los ejemplos que siguen las CDRs de anticuerpos quiméricos y humanizados descritos aquí son las CDRs del anticuerpo del ejemplo 1.

10

EJEMPLO 2

Anticuerpo quimérico

Los anticuerpos alterados incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden regiones variables que se derivan de una especie enlazada a regiones constantes de otras especies. Ejemplos de cadenas de Inmunoglobulina anti-MAG quiméricas de ratón-ser humano de la invención se proveen en las Figuras 1, 2 y 3. Las quimeras de ratón-ser humano que utilizan regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD humanas pueden ser producidas, según las quimeras pueden asociar las regiones variables de ratón con regiones constantes de cadena pesada y ligera de especies no humanas.

La Figura 1 (Sec ID No. 27) provee la secuencia de aminoácido de una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica en la cual la región variable de cadena pesada anti-MAG de murino está asociada

con un secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con una forma alterada de la región constante IgG1 humana, en la cual los residuos Kabat 248 y 250 han sido mutados a alanina con el fin de deshabilitar las funciones ejecutoras de unión a FcγRI y la
5 proteína de complemento C1q (Duncan, A. R. y Winter, G. Localization of the C1q binding site on antibodies by surface scanning, Nature 332, 738-740, 1988. Duncan, A. R., Woolf, J. M. , Partridge, L. J., Burton, D. R. y Winter, G. Localization of the binding site for human FcRt on IgG. Nature 332, 563-564, 1988). Dichas
10 mutaciones se hacen opcionalmente con el fin de adaptar las propiedades de un anticuerpo alterado para lograr un efecto terapéutico particular, por ejemplo, la unión a y bloqueo de la función de un antígeno sin activar los mecanismos ejecutores líticos.

La Figura 2 (Sec ID No. 28) provee la secuencia de aminoácido
15 de una cadena ligera de inmunoglobulina quimérica en la cual la región variable de cadena ligera anti-MAG de murino está asociada con una secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con la región constante kappa humana.

Similarmente, las regiones variables anti-MAG pueden estar
20 asociadas con las regiones constantes de inmunoglobulina que carecen de mutaciones que deshabilitan las funciones ejecutoras. La Figura 3 (Sec ID No. 29) provee la secuencia de aminoácido de una cadena pesada de inmunoglobulina quimérica en la cual la región variable de cadena pesada anti-MAG de murino está asociada con
25 una secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional, y

con un forma de tipo silvestre de la región constante IgG humana.

A partir de la información provista en las Figuras 1 a 3, los insertos de ADNc que codifican estas cadenas quiméricas pueden ser preparados a través de técnicas de biología molecular estándares bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Brevemente, el código genético se utiliza para identificar codones de nucleótido que codifican los aminoácidos deseados, creando una secuencia de ADNc virtual que codifica la proteína quimérica. Si el inserto de ADNc se desea que sea expresado en un organismo particular, entonces los codones particularmente preferidos pueden ser seleccionados de acuerdo con tendencias del uso del codón. La secuencia de nucleótido deseada entonces es sintetizada a través de medios de amplificación PCR de una plantilla que comprende traslapar oligonucleótidos sintéticos los cuales, como un contig, representan la secuencia deseada. El producto resultante también puede ser modificado a través de PCR o mutagénesis para anexar sitios de restricción para facilitar la clonación dentro de un plásmido adecuado para la expresión o manipulaciones adicionales.

20

EJEMPLO 3

Uniones del anticuerpo quimérico a MAG de rata en ELISA

El anticuerpo anti-MAG quimérico que contiene las CDRs de cadena pesada y ligera de la invención se produjo a través de transfección temporal de células CHO. Para esto, se utilizó el

reactivo de transfección Transfast (Promega: E2431) y transfecciones llevadas a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En breve, se colocaron en placas aproximadamente 10^6 células CHO por cavidad en placas de cultivo de 6 cavidades. Al día siguiente se mezcló el ADN de vector de expresión de mamífero que codifica la cadena pesada o ligera apropiada a una relación de 1:1 (5 μ g de ADN total) en medio (Optimem1 con Glutamax; Gibco #51985-026). El reactivo de transfección temporal se agregó y la solución se transfirió a cavidades con capas de célula confluentes. Después de 1 hora a 37°C en el incubador de células, la mezcla de ADN/Transfast se recubrió con 2 ml de medio Optimem y se dejó durante 48-72 horas en el incubador. Los sobrenadantes se cosecharon, se purificaron a través de centrifugación y se pasaron a través de filtros de 0.2 μ m. La concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo de célula CHO se determinó a través de ELISA y se estimó como siendo de alrededor de 0.5 μ g/ml. Para la unión de MAG, se utilizó MAG-Fc de rata comercialmente disponible. Debido a la fusión con Fc humano los anticuerpos quiméricos de enlace no se pudieron detectar utilizando anticuerpos secundarios IgG anti-humanos. Más bien, se utilizó el anticuerpo específico de cadena ligera kappa anti-humano. La Figura 4 muestra que este anticuerpo quimérico se une a MAG aún a una dilución de 1/64. Un anticuerpo humanizado no relacionado y el sobrenadante de cultivo de células transfectadas mock no generaron ninguna señal en este ensayo.

Procedimiento:

Se recubrieron placas de microtitulación ELISA (Nunc Maxisorp) con 1 µg/ml de proteína de fusión MAG-Fc de rata (R&S Systems; 538-MG) en PBS a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron dos veces con PBS y después se bloquearon con PBS/BSA (1% de p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Los sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas temporalmente se pasaron a través de filtros de 0.2 µm y se diluyeron serialmente en PBS/BSA iniciando en el sobrenadante nítido a una dilución de 1/64. Las diluciones de muestra se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas después se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 (0.1% v/v). El anticuerpo de detección fue conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera kappa anti-humano de cabra (Sigma A-7164) diluido a 1/2000 en PBS/BSA. El anticuerpo de detección se incubó a durante 1 hora a temperatura ambiente y las placas se lavaron como anteriormente. La solución del substrato (Sigma Fast OPD P-9187) se agregó y se incubó hasta que se detectó el desarrollo del color apropiado y después se detuvo utilizando 3M de H₂SO₄. El desarrollo del color se leyó a 490 nm.

EJEMPLO 4**Anticuerpos humanizados**

Los anticuerpos alterados incluyen anticuerpos humanizados

que comprenden regiones variables humanizadas enlazadas a la regiones constantes humanas. Ejemplos de cadenas de Inmunoglobulina anti-MAG humanizadas de la invención se proveen en la Figura 5. Los anticuerpos humanizados utilizando las regiones
5 constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD pueden ser producidas.

La Figura 5 (Sec ID No: 30) provee un ejemplo de la secuencia de aminoácido de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada en la cual la región variable de cadena pesada anti-MAG
10 humanizada está asociada con una secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional, y con una forma alterada de la región constante IgG1 humana, en la cual los residuos Kabat 248 y 250 han sido mutados a alanina con el fin de deshabilitar las funciones ejecutoras de unión a FcγRI y la proteína de complemento C1q
15 (Duncan, A. R. y Winter, G. Localization of the C1q binding site on antibodies by surface scanning, Nature 332, 738-740, 1988. Duncan, A. R., Woolf, J. M. , Partridge, L. J., Burton, D. R. y Winter, G. Localization of the binding site for human FcRt on IgG. Nature 332, 563-564, 1988). Dichas mutaciones se hacen opcionalmente con el
20 fin de adaptar las propiedades de un anticuerpo alterado para lograr un efecto terapéutico particular, por ejemplo, la unión a y bloqueo de la función de un antígeno sin activar los mecanismos ejecutores líticos.

La Figura 5 (Sec ID No. 31) provee la secuencia de aminoácido
25 de una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada en la cual la

región variable de cadena ligera anti-MAG humanizada está asociada con una secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional y con la región constante kappa humana.

Similarmente, las regiones variables anti-MAG pueden estar asociadas con las regiones constantes de inmunoglobulina que carecen de mutaciones que deshabilitan las funciones ejecutoras. La Figura 5 (Sec ID No. 32) provee la secuencia de aminoácido de una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada en la cual la región variable de cadena pesada anti-MAG humanizada está asociada con una secuencia de señal de secreción de inmunoglobulina funcional, y con un forma de tipo silvestre de la región constante IgG1 humana.

A partir de la información provista en la Figuras 5, los insertos de ADNc que codifican estas cadenas humanizadas pueden ser preparados a través de técnicas de biología molecular estándares bien conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Brevemente, el código genético se utiliza para identificar codones de nucleótido que codifican los aminoácidos deseados, creando una secuencia de ADNc virtual que codifica la proteína. Si el inserto de ADNc se desea que sea expresado en un organismo particular, entonces los codones particularmente preferidos pueden ser seleccionados de acuerdo con tendencias del uso del codón. La secuencia de nucleótido deseada entonces es sintetizada a través de medios de amplificación PCR de una plantilla que comprende traslapar oligonucleótidos sintéticos los cuales, como un contig, representan la secuencia deseada. El producto resultante también

puede ser modificado a través de PCR o mutagénesis para anexar sitios de restricción para facilitar la clonación dentro de un plásmido adecuado para la expresión o manipulaciones adicionales.

5

EJEMPLO 5

Unión de Anticuerpos anti-MAG humanizados a MAG de rata y de ser humano en Elisa

1) Unión directa de ELISA a proteína de fusión MAG-Fc de
 10 rata de cantidades normalizadas del sobrenadante de cultivo para
 9 combinaciones de cadena pesada y ligera humanizadas

Los anticuerpos anti-MAG humanizados que contienen las
 CDRS de cadena ligera y pesada de la invención se produjeron a
 través de la transfección temporal de células CHO. Para esto, se
 15 utilizó el reactivo de transfección Transfast (Promega: E2431) y
 transfecciones llevadas a cabo de acuerdo con las instrucciones del
 fabricante. En breve, se colocaron en placas aproximadamente 10^6
 células CHO por cavidad en placas de cultivo de 6 cavidades. Al día
 siguiente se mezcló el ADN de vector de expresión de mamífero que
 20 codifica la cadena pesada o ligera apropiada a una relación de 1:1 (5
 μ g de ADN total) en medio (Optimen1 con Glutamax; Gibco #51985-
 026). El reactivo de transfección temporal se agregó y la solución se
 transfirió a cavidades con capas de célula confluentes. Después de 1
 hora a 37°C en el incubador de células, la mezcla de ADN/Transfast
 25 se recubrió con 2 ml de medio Optimem y se dejó durante 48-72

horas en el incubador. Los sobrenadantes se cosecharon, se purificaron a través de centrifugación y se pasaron a través de filtros de 0.2 µm. Se produjeron 9 combinaciones de cadena variable ligera y pesada de las secuencias mostradas en el siguiente cuadro y las regiones constantes de cadena pesada de IgG1 fueron funcionales de acuerdo con la Sec. ID.

	Sec ID No (V-regiones)	Descripción	Nombre alternativo
	13	Vh humanizado	BVh1
	14	Vh humanizado	BVh2
10	15	Vh humanizado	BVh3
	16	Vh humanizado	CVI1
	17	Vh humanizado	CVI2
	18	Vh humanizado	CVI3
	19	VI humanizado	CVI4

15 La concentración del anticuerpo se determinó a través de ELISA y las cantidades de sobrenadante utilizadas en los ensayos normalizados a una concentración de 250 o 500 ng/ml (dependiendo de la concentración del sobrenadante de cultivo). Como antígeno, se utilizó ratMAG-Fc comercialmente disponible (R&Systems; 538-MG).

20 Debido a la fusión de este antígeno con Fc humano, los anticuerpos quiméricos unidos no pudieron ser detectados utilizando anticuerpos secundarios IgG anti-humanos generales. Más bien, se utilizó el anticuerpo específico de cadena ligera kappa anti-humano. La Figura 6 muestra que los 9 anticuerpos humanizados examinados se unieron

25 a MAG de rata con curvas de unión muy similares de forma

descendente a aproximadamente 4 ng/ml. El anticuerpo quimérico utilizado como una referencia mostró características de unión que caen dentro del grupo de los anticuerpos humanizados examinados aquí. Aunque no es absoluto, esto puede sugerir que las afinidades de los anticuerpos humanizados examinados aquí yacen muy cerca dentro del rango de afinidad del anticuerpo quimérico no humanizado utilizado como una referencia aquí.

Procedimiento

10 Se recubrieron placas Maxisorp de 96 cavidades durante la noche a 4°C con proteína de fusión MAG-Fc de rata (1 µg/ml; R&D Systems; No. Cat. 538-MG) en PBS. Las placas se lavaron dos veces con PBS conteniendo Tween20 (0.1% v/v; PBST) y se bloquearon con PBS conteniendo BSA (0.1% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Las cantidades variables de sobrenadantes de cultivo se diluyeron de forma serial en regulador de pH de bloqueo y se agregaron a las cavidades bloqueadas iniciando aproximadamente a 500 o 250 ng/ml. Las concentraciones de anticuerpo del sobrenadante se basaron en ensayos independientes midiendo la cantidad de anticuerpo humanizado presente en cada sobrenadante de cultivo. El anticuerpo de ratón-ser humano quimérico (no humanizado) también se incluyó como referencia. Las muestras de anticuerpo se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y las placas después se lavaron tres veces con PBST. El anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera

anti-humano de cabra; Sigma A-7164) se agregó a una dilución de 1/5000 en regulador de pH de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron tres veces como anteriormente y la unión se detectó a través de la adición del
5 sustrato (tabletas OPD disueltas de acuerdo con las instrucciones; Sigma P-9187). El desarrollo del color se monitoreó y la reacción se detuvo utilizando 3M de H_2SO_4 . El desarrollo del color se leyó a 490 nm.

10 **2) Unión directa de ELISA a proteína de fusión MAG-Fc de rata de dos combinaciones de cadena pesada-ligera del anticuerpo anti-MAG humanizado purificado**

Dos anticuerpos humanizados que consisten de combinaciones de la región variable de cadena pesada y ligera BVh1/Cv11 y
15 BVh3/Cv13 (cuadro Figura 5) y una región constante IgG1 mutada se ejemplificaron a través de SEC.I.D.NO: 30 (la cual es IgG1 mutado BVh1/Cv11, aquellos con experiencia en la técnica pueden fácilmente derivar la secuencia del equivalente BVh3/Cv13) se produjeron a través de una versión escalada hacia arriba de la transfección
20 temporal descrita en el Ejemplo 3 y purificada utilizando cromatografía de afinidad de proteína A. El material del anticuerpo purificado se dializó contra PBS y la concentración se determinó a través de la lectura OD280. Las concentraciones del anticuerpo se ajustaron a 5000 ng/ml y se utilizaron como diluciones seriales en
25 MAG-FC de rata uniéndose a ELISA. La Figura 7 muestra que el

material de anticuerpo purificado se une a MAG-Fc de rata y que ambas combinaciones de la región variable de cadena pesada y ligera probadas aquí son extremadamente similares.

5 Método:

Se recubrieron placas Maxisorp Nunc de 96 cavidades durante la noche a 4°C con proteína de fusión MAG-Fc de rata (2.5 µg/ml; R&D Systems; No. Cat. 538-MG) en PBS: Las placas se lavaron dos veces con PBS conteniendo Tween20 (0.1% v/v; PBST) y se
10 bloquearon con PBS conteniendo BSA (0.1% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). El anticuerpo humanizado purificado se ajustó a una concentración inicial de 5 µg/ml en regulador de pH de bloqueo y después se diluyó serialmente. Las muestras del anticuerpo se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y las placas
15 se lavaron 3 veces con PBST. El anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de cadena ligera anti-humano de cabra; Sigma A-7164) se agregó a una dilución de 1/5000 en regulador de pH de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron tres veces como anteriormente y la unión
20 se detectó a través de la adición del substrato (tabletas OPD disueltas de acuerdo con las instrucciones; Sigma P-9187). El desarrollo del color se monitoreó y la reacción se detuvo utilizando 3M de H₂SO₄. El desarrollo del color se leyó a 490 nm.

Resultados:

Ambos anticuerpos humanizados purificados que llevaron ninguna o varias mutaciones de estructura mostraron una unión extremadamente similar a MAG de rata. Los resultados se ven en la

5 Figura 7.

3) Unión a MAG humano expresado en células CHO de cantidades normalizadas de sobrenadante de cultivo de dos combinaciones de cadena pesada y ligera humanizadas

10 Las mismas combinaciones de cadena pesada y ligera variables humanizadas descritas en el Ejemplo 5 2) fueron probadas como sobrenadantes de cultivo purificados contra MAG humano expresado en la superficie de células CHO. La cantidad de sobrenadante de cultivo utilizada para cada anticuerpo fue normalizada en base a las

15 concentraciones del anticuerpo determinadas por ELISA. Para esto, se recubrieron placas de 96 cavidades (Nunc Maxisorp) durante la noche a 4°C con cadena IgG (gama) anti-humano de cabra (Sigma I-3382; en regulador de pH de bicarbonato pH 9.6; 2 µg/ml). Al día siguiente, las placas se lavaron dos veces con regulador de pH de

20 lavado (PBST) y se bloquearon a través de la adición de por lo menos 75 µl de regulador de pH de bloqueo (PBS conteniendo BSA 1% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de muestra del anticuerpo se diluyó de forma serial en regulador de pH de bloqueo (iniciando con una dilución pura o 1/2) en duplicado. El

25 estándar Ab fue anticuerpo IgG1 humanizado purificado de una

191

especificidad no relacionada y concentración conocida. La solución estándar también se diluyó de forma serial a través de las placas iniciando a 500 ng/ml. Todas las soluciones de anticuerpo se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces como anteriormente y después se incubaron con conjugado de peroxidasa específico de cadena (libre y enlazado) ligera (kappa) anti-humana de cabra (Sigma; A-7164) a 1/5000 en regulador de pH de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se volvieron a lavar tres veces como anteriormente y se incubaron con una solución de sustrato (tabletas OPD; Sigma P-9187 utilizando desarrollo de color fuerte). El desarrollo del color se detuvo a través de la adición de 25 µl de 3M de H₂SO₄ y la placa se leyó a 490 nm.

La Figura 8 muestra que ambos anticuerpos probados aquí reconocen MAG humano y son muy similares en sus características de unión. CHO/- son controles negativos de células CHO con no MAG expresado.

Método para ELISA basado en células Eu

Se rellenaron placas de 96 cavidades (Costar 3595) con 100 µl de suspensión de célula/cavidad (ver cuadro siguiente para el número de células recomendado para llevar a cabo el ensayo en los días 1, 2, 3, o 4).

5

Día	Número de célula/ml
1	3 x 10 ⁵
2	1 x 10 ⁵
3	5 x 10 ⁴
4	1 x 10 ⁴

10

15

20

El medio de cultivo se removió y las placas se removieron con DMEM/F12 (Sigma D6421), conteniendo FCS (10%), BSA (1%), NaN₃ (1%; regulador de pH de bloqueo) durante 1 hora temperatura ambiente. La solución de bloqueo después se removió y se agregó la muestra (en regulador de pH de bloque 50 µl/cavidad). Las muestras se incubaron a 4°C durante 1 hora. Las placas después se lavaron tres veces con PBS utilizando un lavador de placas Skatron. Después del lavado, las células se fijaron con 5% de paraformaldehído (diluido en PBS) durante 20 minutos a 4°C y se volvieron a lavar como anteriormente. Se agregaron 50 µl/cavidad de anticuerpo secundario conjugado de Europio diluido en regulador de pH de Europio (50 mM base Tris, 150 mM de NaCl, 0.5% de BSA, 0,1 g/l, Tween20, 7.86 mg/l de DTPA a un pH de 7.3) y se incubaron durante 1 hora a 4°C.

25

A las placas lavadas como se mencionó anteriormente se le agregaron 200 µl de mejorador Delphia de solución/cavidad. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Las cavidades se leyeron dentro de las 24 horas en un Victor.

4) Competición de ELISA para la unión a proteína de fusión MAG-Fc de rata de dos anticuerpos humanizados purificados y el anticuerpo monoclonal de ratón no humanizado

Método:

- 5 Se recubrieron placas Maxisorp Nunc de 96 cavidades durante la noche a 4°C con proteína de fusión MAG-Fc de rata (2.5 µg/ml; R&D Systems; No. Cat. 538-MG) en PBS: Las placas se lavaron dos veces con PBS conteniendo Tween20 (0.1% v/v; PBST) y se bloquearon con PBS conteniendo BSA (0.1% p/v) durante 1 hora a
- 10 temperatura ambiente (RT). El anticuerpo humanizado purificado se ajustó a una concentración inicial de 200 ng/ml y se mezcló a un volumen igual con moléculas competidoras hechas en regulador de pH de bloqueo en la escala de 6000 a 0 ng/ml. Las competidoras fueron ya sea anticuerpo monoclonal de ratón parenteral (anti-MAG)
- 15 o un anticuerpo monoclonal de ratón no relacionado (INN1) a las mismas concentraciones (BVh1/CV11 solo). Las soluciones de anticuerpo/ competidora se incubaron durante 1 hora temperatura ambiente y las placas después se lavaron tres veces con PBST. El anticuerpo secundario (conjugado de peroxidasa específico de
- 20 cadena ligera anti-humano de cabra; Sigma A-7164) se agregó a una dilución de 1/5000 en regulador de pH de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron tres veces como se mencionó anteriormente y la unión se detectó a través de la adición del sustrato (tabletas OPD disueltas de acuerdo
- 25 con las instrucciones; Sigma P-9187). El desarrollo del color se

midló a 490 nm.

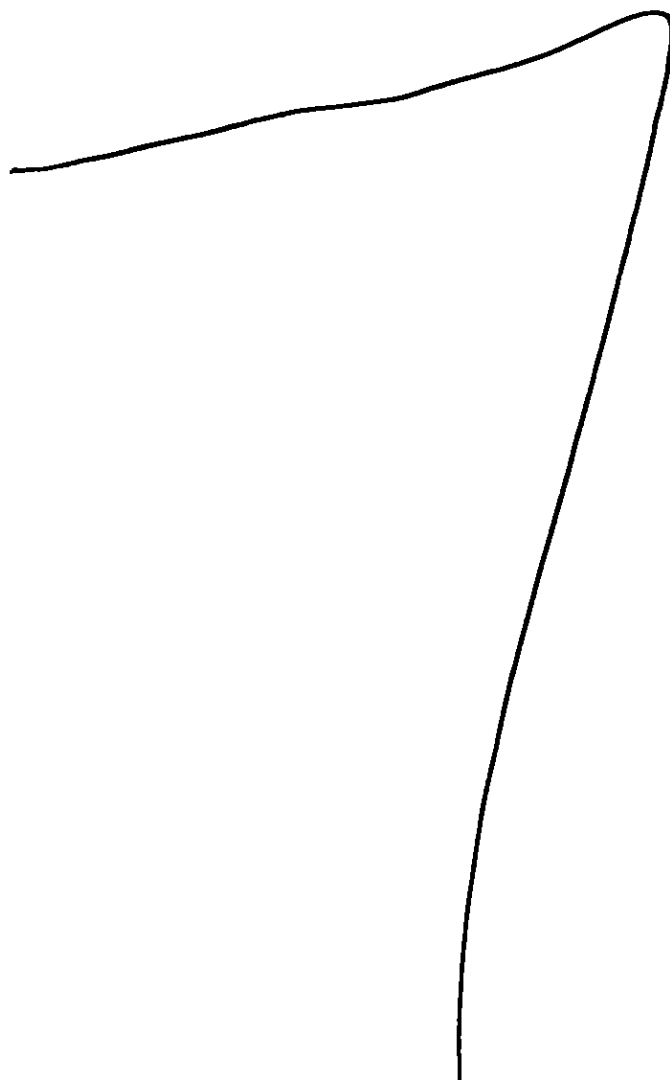
Resultados:

Ambas preparaciones de anticuerpo purificado compiten
5 igualmente a través del anticuerpo monoclonal de ratón original pero
no a través de un anticuerpo monoclonal de ratón que tiene una
especificidad no relacionada, ver Figura 9. Esto muestra que el
anticuerpo monoclonal de ratón original y los anticuerpos
humanizados probados aquí probablemente reconocen el mismo
10 epítipo y posiblemente tienen afinidades muy similares a MAG de
rata.

15

20

25



REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo alterado o fragmento funcional del mismo que se une a y neutraliza MAG y que comprende una o más de las siguientes CDRs:

CDRs de cadena ligera

CDR	<i>De acuerdo con Kabat</i>
L1	KSSHSVLYSSNQKNYLA
L2	WASTRES
L3	HQYLSSLT

CDRs de cadena pesada

CDR	<i>De acuerdo con Kabat</i>
H1	NYGMN
H2	WINTYTGEPTYADDFTG
H3	NPINYYGINYEGYVMDY

2. Un anticuerpo alterado o fragmento funcional del mismo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una o más CDRs seleccionadas de CDRH1, CDRH2, y CDRH3 y/o un dominio variable de cadena ligera que comprende una o más CDRs seleccionadas de CDRL1, CDRL2, y CDRL3.

3. Un anticuerpo anti-MAG alterado o fragmento funcional del mismo que comprende:

un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende regiones hipervariables en secuencia CDRH1, CDRH2 y CDRH3

y/o

un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende
5 regiones hipervariables en secuencia CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, el cual es monoclonal.

5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el cual es humanizado.

10 6. Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácido:

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
15 MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA
RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (SEC ID No 13).

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCA
20 RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (Secuencia ID No 14)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEW
MGWINTYTGEPTYADDFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTATYFCA
RNPINYYGINYEGYVMDYWGQGLTVTVSS (Secuencia ID No 15)

25 7. Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo

con la reivindicación 6, que además comprende una región variable de cadena ligera que comprende la Secuencia de aminoácido ID No 16, 17, 18 o 19;

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSH~~SVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP~~
5 PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQAEDVAVYYCHQYLS~~
~~SLTFGQG~~GTKLEIKRTV (SEC ID No 16)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSH~~SVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP~~
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTII~~NLQAEDVAVYYCHQYLS~~
10 ~~SLTFGQG~~GTKLEIKRTV (SEC ID No 12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSH~~SVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP~~
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLHTEDVAVYYCHQYLS~~
~~SLTFGQG~~GTKLEIKRTV (SEC ID No 18)

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSH~~SVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP~~
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTII~~NLHTEDVAVYYCHQYLS~~
~~SLTFGQG~~GTKLEIKRTV (SEC ID No 19)

8. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 6-7, que comprende:

20 un fragmento variable de cadena pesada que comprende SEC ID No 13, 14 o 15

y una parte constante del fragmento del mismo de una cadena pesada humana

y

25 un fragmento variable de cadena ligera que comprende SEC ID

No. 16, 17, 18 o 19 y una parte constante o fragmento del mismo de una cadena ligera humana.

9. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes seleccionado de los anticuerpos que
5 comprenden:

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 16;

10 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 17;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 18;

15 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 13 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19;

20 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 16;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 17;

25 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID

No 18;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 14 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19;

5 Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 16;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID
10 No 17;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 18;

Una región variable de cadena pesada que comprende Sec ID
15 No 15 y una región variable de cadena ligera que comprende Sec ID No 19.

10. Un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada que comprende la Secuencia Id No. 15.

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC
20 CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGTTCTGGATACACCTTCACTAACTAC
GGCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGAT
GGGATGGATCAACACCTACACGGGCGAGCCACCTACGCCGACGAC
TTCACGGGCCCGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGC
ATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCACCTATTT
25 CTGTGCGAGAAACCCCATCAACTACTACGGCATCAACTACGAGGGCT

ACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

11. Una secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácido ID No 14 es:

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC
 5 **CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCCTGGATAACACCTTCACTAACT**
ACGGCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG
GATGGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGAAC
GACTTCACGGGCCGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCRGTCAGCACG
GCATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTAT
 10 **TTCTGRGCGAGAAAACCCATCAACTACTACGGGCATCAACTACGAGGG**
CTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGGCACACTAGTCACAGTCTCCT
CA

12. Una secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácido ID No 15 es:

15 **CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGC**
CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGTTCTGGATACACCTTCACTAACTAC
GGCATGAACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGAT
GGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCACCTACGCCGACGAC
TTACCGGGCCCGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGC
 20 **ATATCTGCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGAGGACACTGCCACCTATTT**
CTGTGCGAGAAAACCCCATCAACTACTACGGGCATCAACTACGAGGGCT
ACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

13. Un polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido Id No 16 es:

25 **GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG**

CGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTGTA
CAGCAGCAACCAGAAGAAGTAACCTTGGCCTGGTACCAGGCAGAAACC
 AGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCGGGGAA
TCCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATT
 5 TCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATT
 ACTGTCACCAGACCTGAGCAGCCTGACCTTTTGGCCAGGGGACCAAGC
 TGGAGATCAAACGTACGGTG

14. Un polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido
 Id No 17 es:

10 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGGCCACCATCAATCTGCAAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTAC
AGCAGCAACCAGAAGAAGTAACCTTGGCCTGGCCAAGCAGAAACCAG
 GACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCGGGGAATCC
 GGGGTCCCTGACCCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA
 15 CTCTCACCATCATACCACCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTA
 CTGTCACCAGTACCTGAGCAGCCTGACCTTTTGGCCAAGGGGACCAAG
 CTGGAGATCAAACGTACGGTG (SEC ID No 24)

15. Un polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido
 Id No 18 es:

20 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG
 CGAGAGGGGCCACCATCAACTGAAAGAGCAGCCACAGCGTFCTGTACAG
CAGCAACCAGAAGAAGTAACCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAC
 AGCCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCGGGGAATCCGG
 GGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTC
 25 TCACCATCAGCAGCCTGCACACCGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTC

12

ACCAGTACCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAACGTACGGTG

16. Un polinucleótido que codifica la Secuencia de aminoácido
 Id No 15 es:

5 **GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGG**
CGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCACAGCGTGCTGTAC
AGCAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAG
GACAGCCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATC
CGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCA
 10 **CTCTCACCATCATCAACTGCACACCGAAGATGTGGCAGTTTATTACTG**
TCACCAGTACCTGAGCAGCCTGACCTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG
AGATCAAACGTACGGTG

17. Una composición farmacéutica que comprende un
 anticuerpo anti-MAG alterado o un fragmento funcional del mismo de
 15 acuerdo con las reivindicaciones 1-8 junto con un diluyente o
 portador farmacéuticamente aceptable.

18. Un método para el tratamiento o profilaxis de derrame
 cerebral u otras enfermedades/trastornos neurológicos en un ser
 humano, que comprende la administración a dicho ser humano en la
 20 necesidad del mismo de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-
 MAG, de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 incluyendo anticuerpos
 alterados o un fragmento funcional de los mismos.

19. El uso de un anticuerpo anti-MAG de acuerdo con las
 reivindicaciones 1-8, incluyendo anticuerpos alterados o un
 25 fragmento funcional de los mismos, en la preparación de un

76

medicamento para el tratamiento o profilaxis de derrame cerebral u otras enfermedades/trastornos neurológicos.

20. Un método para inhibir la neurodegeneración y/o promover la recuperación funcional en un paciente ser humano que sufre, o
5 está en riesgo de desarrollar, un derrame cerebral u otras enfermedades/trastornos neurológicos que comprende administrar a dicho ser humano en la necesidad del mismo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MAG de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, incluyendo anticuerpos alterados o un fragmento funcional de los
10 mismos.

21. El uso de un anticuerpo anti-MAG de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, incluyendo anticuerpos alterados o un fragmento funcional de los mismos, en la preparación de un medicamento para inhibir la neurodegeneración y/o promover la
15 recuperación funcional en un paciente ser humano que sufre, o está en riesgo de desarrollar, un derrame cerebral u otras enfermedades/trastornos neurológicos.

22. Un método para el tratamiento o profilaxis de derrame cerebral u otras enfermedades/trastornos neurológicos en un ser
20 humano que comprende el paso de la administración parenteral de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-MAG a dicho ser humano.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo anti-MAG se administra intravenosamente.

25 24. El método de acuerdo con la reivindicación 18, 20 o 24, en

donde las otras enfermedades/trastornos neurológicos se seleccionan del grupo que consiste de: daño traumático al cerebro, y daño a la espina dorsal, enfermedad de Alzheimer, demencias fronto-temporales (tauopatías), neuropatía periférica, enfermedad de 5 Parkinson, enfermedad de Huntington, y esclerosis múltiple.

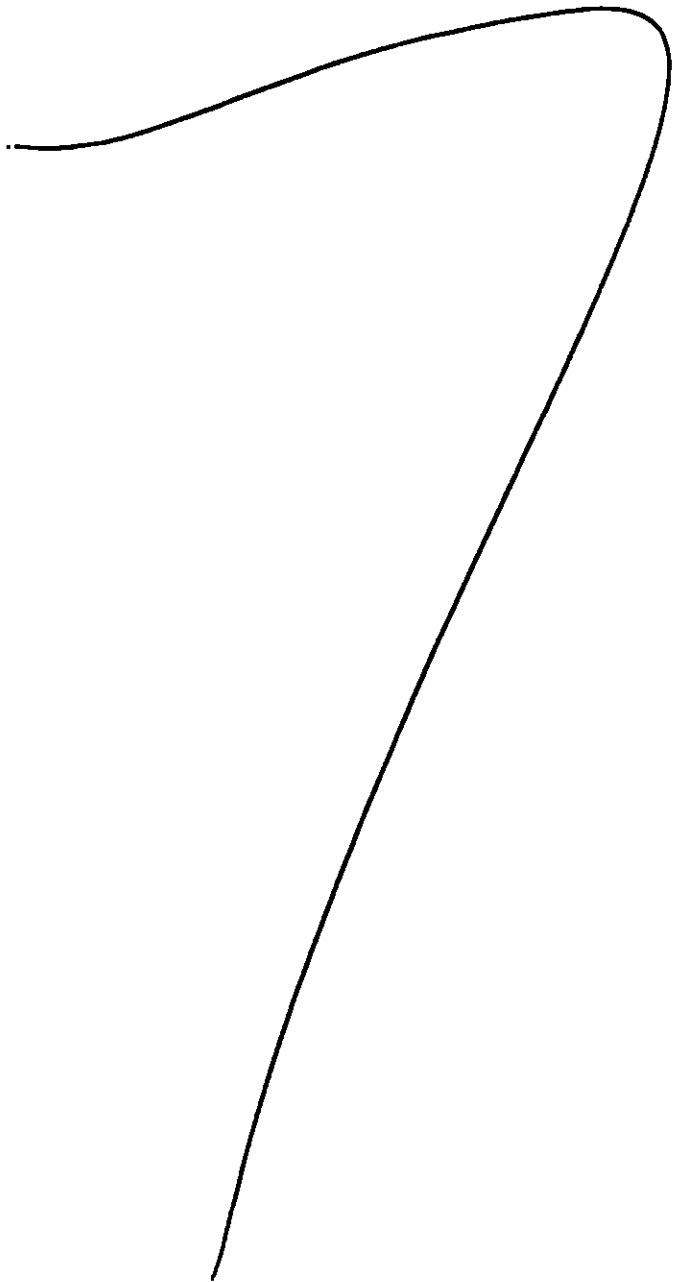
25. Un método para promover el desarrollo de axones que comprende el paso de poner en contacto un axón humano con un anticuerpo anti-MAG de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el 10 método es *in vitro*.

15

20

25



Fugura 1.

MGHSCIILFLVATATGVHSEIQLVQSGPELKKPGFINKISCKASOYTFINYGMWVKQAPGKGLXN
 MOWINTYTGEPYADDFTQRFAPSLTSASTATLQISNLKEDTATYFCANPINYQINYEQYVH
 DYWOQGTLLVTVSSASTKGPSEVFFLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYTFEPVTVSNNSGALTSQVHTY
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVSEKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCFAPILAG
 APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFSWYVDOVEVEDAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQOHLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTLSKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVNHEALHE
 HYTQKSLSLSPDK

Fugura 2.

MGWSCIILFLVATATGVHSHNIMHTQSPSSLAVSAGRKVTMSCKSSHSVLYBSNQKNYLAWYQOKPG
QSPKLLIYWASTREBGVPDRFTGSGSGTDPTLTIIINVHTEDLAVYYCHQYLSSLTFGTGTLKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKNVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTEQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 3.

MGNSCIILFLVATATOVRSKIQLVQSGPELKKPGSTNKISCKASGYTFTNYGMHWVKQAPGRGLJW
 NGWINTYTGEPYADOFTRPAFSLSTASTAYLQISHLKEDTATYFCARNPIHYGIDYBOYVH
 DYNQOQTLVTVSEASTGSPSVYPLAPSSKSTSGCTAALGCLVIDYFPEPTVSWNEGALTSGVETP
 PAVLQSBGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNEKPSNTKVDKKVEFKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSEVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFPMYVDQVEVENAKTKPREEQDMSTYK
 VSVLTVLRQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPISEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVENESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSWMEDEALHN
 NYTQKSLSLSPGK

Figura 4.

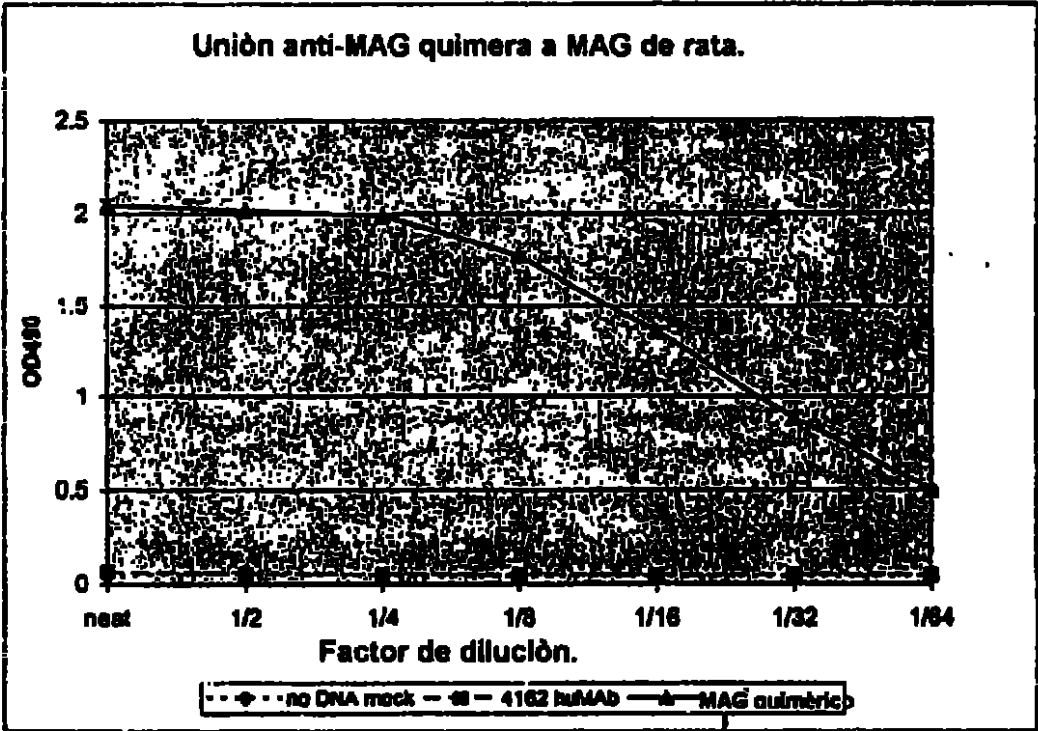


Figura 5.**Seq ID No: 30**

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGM
 NWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFTRFVFSLDTSVSTAYLQISSL
 KAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGA
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

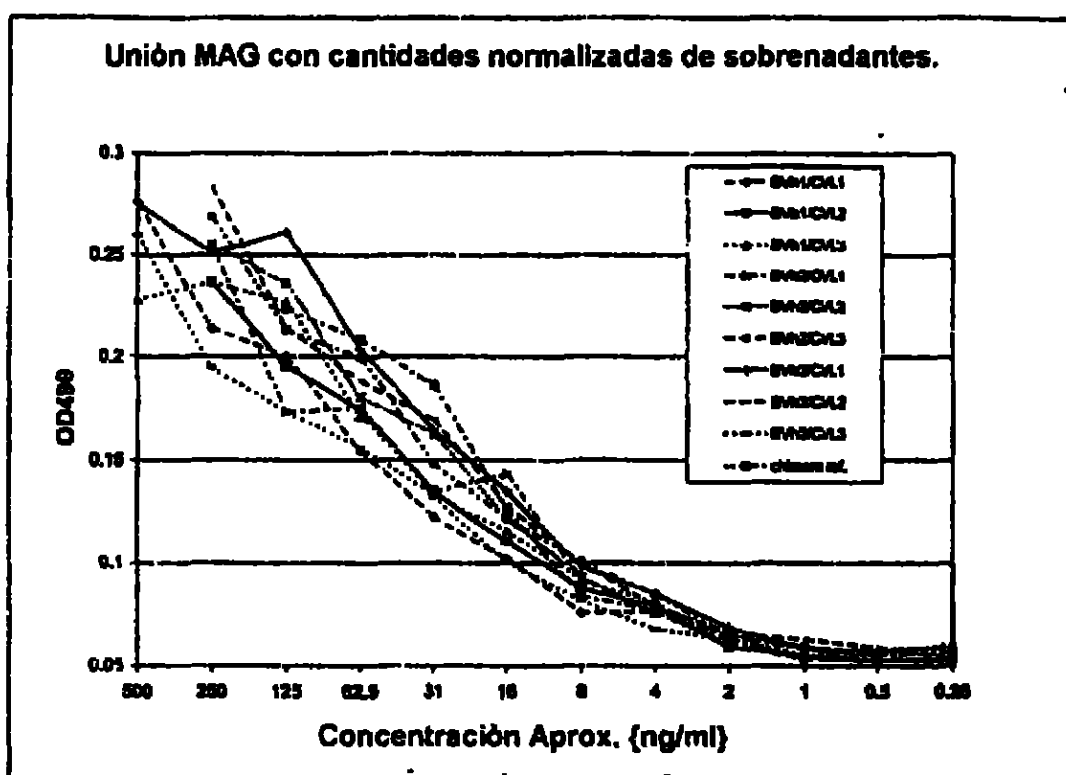
Seq ID No: 31

MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSHSVLYSSN
 QKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE
 DVAVYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Seq ID No: 32

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGM
 NWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFTRFVFSLDTSVSTAYLQISSL
 KAEDTAVYYCARNPINYYGINYEGYVMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 6.



Material de anticuerpo purificado a concentraciones determinadas a traves de OD280.

Figura 7.

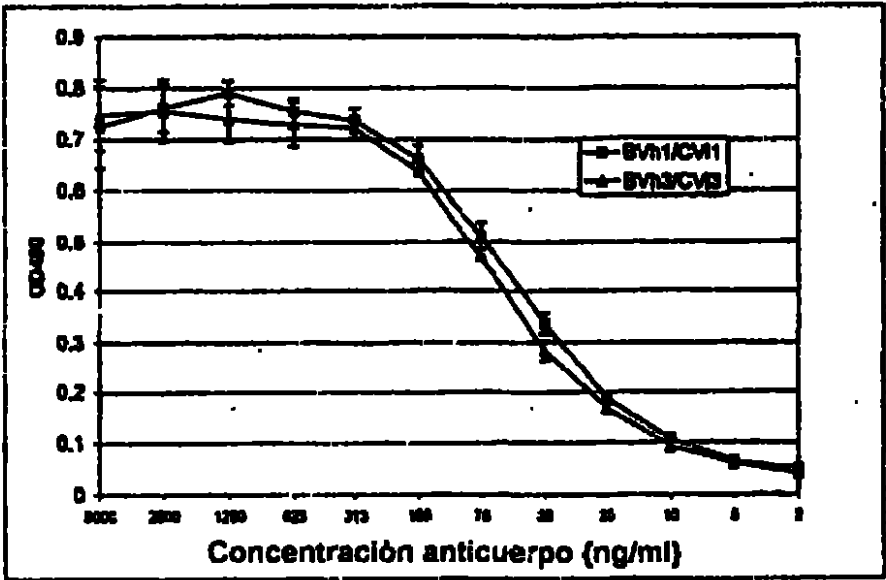


Figura 8.

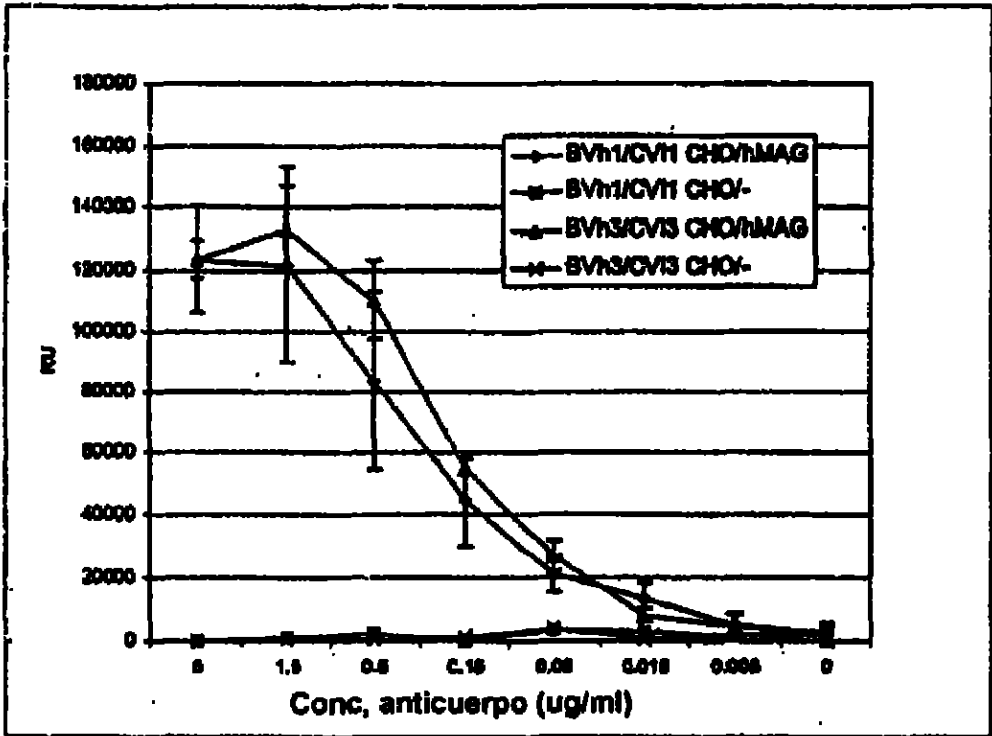
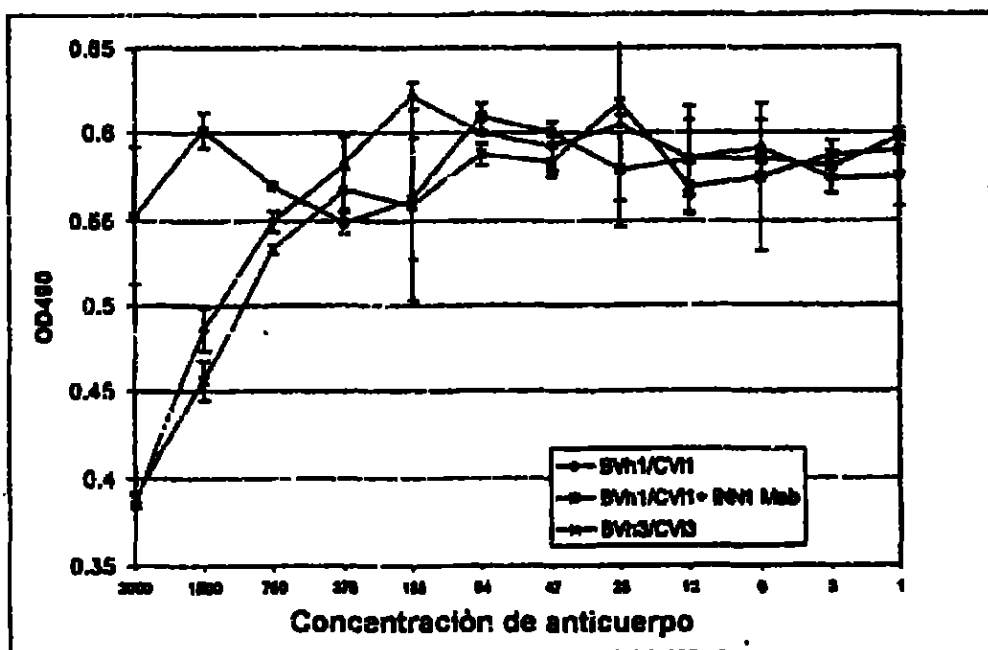


Figura 9.

Competición de ELISA para la unión de proteína de fusión MAG-Fe de rata de dos anticuerpos purificados humanizados y el anticuerpo mono clonal de raton no humanizado.



TRADUCCION OFICIAL No. 2005-01-28-033 de un documento escrito en inglés/español, la cual para efectos del presente lleva el sello personal de **Martha Lucia Arciniegas M.**, Traductora e Intérprete Oficial en virtud de la Res 1523 /88 del Ministerio de Justicia.

TRASPASO

Legalización de un Traspaso, documento escrito simultáneamente en inglés y en español, en el cual los suscritos **Volker GERMASCHEWSKI** y **Jonathan Henry Welbore ELLIS**, ceden a Glaxo Group Limited los derechos, título e interés sobre mí (nuestra) invención llamada "ANTICUERPOS DE GLICOPROTEINA ASOCIADA CON ANTIMIELINA (MAG)

Lugar y fecha: Stevenage, Hets, GB 3 de diciembre del 2004

(firma ilegible)

Volker GERMASCHEWSKI

Lugar y fecha: Stevenage, Hets, GB 3 de diciembre del 2004

(firma ilegible)

Jonathan Henry Welbore ELLIS

En español legalización mediante Notario Público del documento precedente

(firma ilegible)

James Kerr MILLIGAN

Notario Público de Londres, Inglaterra

APOSTILLA

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

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

- 1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
- 3. actuando como Notario Público
- 4. y lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

- 5. en Londres
- 6. el 20 de diciembre del 2004
- 7. Por el Secretario Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
- 8. No. G585750
- 9. Timbre/Sello
- 10. Firma: (ilegible)
- Aparece el Sello de la Oficina
- A. Walakira
- de Asuntos Exteriores y del Commonwealth

Según mi mejor leal saber esta es una traducción fiel y completa de su original en inglés de la cual se deja copia para futura referencia.

**MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES**

308807
Martha Arciniegas
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas

**NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO**

2005 ENE 27 A 10:52
mas
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Martha Arciniegas
MARTHA LUCIA ARCINIEGAS M.
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION 1523/88 MINJUSTICIA

Yo, el infrascrito, James Kerr MILLIGAN, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE la Cesión que se adjunta fue firmada por:

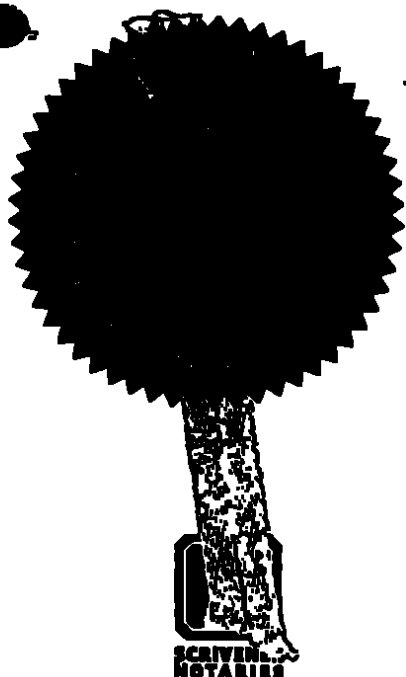
Don Volker GERMASCHEWSKI, titular de tarjeta de identidad alemana número 6047123838; y

Don Jonathan Henry Welbore ELLIS, titular de pasaporte británico número 028550784 expedido por la Agencia de Pasaportes del Reino Unido el día 19 de agosto de 1997.

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



James Kerr MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



122

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

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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

This public document / Le présent acte public

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

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le **20 December 2004**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G585750**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **A. Walakira**



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

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

Colombia

PG4912

ASSIGNMENT	CESION
Volker GERMASCHEWSKI Jonathan Henry ELLIS By means of this document assign to Glaxo Group Limited A company organized under the laws of Great Britain Domiciled in Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex, UB6 0NN, Great Britain (hereinafter referred to as the ASSIGNEE). All my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in: ANTI-MYELIN ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (MAG) ANTIBODIES So far as the Republic of Colombia is concerned. Place and date: <i>STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, GB</i> <i>3rd DECEMBER 2004</i>  Volker GERMASCHEWSKI Place and date: <i>STEVENAGE, HERTFORDSHIRE, GB</i> <i>3 DECEMBER 2004</i>  Jonathan Henry ELLIS	Volker GERMASCHEWSKI Jonathan Henry ELLIS por medio de la present cedo (cedemos) a Glaxo Group Limited una <u>compañía</u> organizada baja las leyes de Gran Bretaña domiciliada en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex, UB6 0NN, Gran Bretaña (de ahora en adelante el CESIONARIO), todos mis (nuestros) derechos, titulo e interes sobre mi (nuestra) invencion tal como describe en: Anticuerpos de Glicoproteina asociada con antimielina (MAG) En lo que concierne a la Republica de Colombia. Place and date:

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 25
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 118
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x] INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

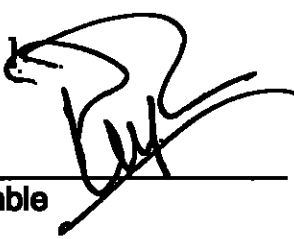
- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

Firma Responsable 

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



130

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 132

2020
Bogotá DC**Doctor**
ALICIA LLORED A RICAURTE
Representante y/o Apoderado
GLAXO GROUP LIMITED**REFERENCIA:**

Radicación No.	05 8403
Solicitud Internacional	PCT/EP2003/08749
Fecha inicio fase nacional	08-03-2005
Trámite	011
Evento	379
Actuación	418
Oficio No.	192
Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC**6 MAR. 2005**
ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia