SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-106682- -00000-0000

Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 13-106682

54. **TITULO** MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

/o de radicación

AS. 124.453

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/059964	Fecha	09.11.2011
Publicación Internacional No.	WO 2012/064836	Fecha	18.05.2012

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1.	GENENTECH, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	1 DNA Way, 94080	No. TELÉFONO	
CIUDAD	South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	CA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	CA
PAÍS DE RESIDENCIA	US		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	ATWAL	Jasvinder	CA
2.	CHEN	Yongmei	US
3.	CHIU	Cecilia Pui Chi	CA
4.	LAZARUS	Robert A.	US
5.	WANG	Weiru	US
6.	WATTS	Ryan J.	US
7.	WU	Yan	US
8.	ZHANG	Yingnan	CN

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
2.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
3.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
4.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
5.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
6.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
7.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
8.	US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO	JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492

DIRECCIÓN	Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO	7442200
CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS	CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.	US	US	61/456,642	2010.11.10
2.	US	US	61/418,310	2010.11.30
3.	US	US	61/418,850	2010.12.01
4.	US	US	61/426,425	2010.12.22

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	**No.** 13-24256, 13-24271, 13-27243, 13-33559, 13-3582	**Fecha:** 15.04.2013

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL *Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)*

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 4-115
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 73
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 244-282
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar:

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

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

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 May 2012 (18.05.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/064836 A9

(51) International Patent Classification:
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/059964

(22) International Filing Date:
9 November 2011 (09.11.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/456,642	10 November 2010 (10.11.2010)	US
61/418,310	30 November 2010 (30.11.2010)	US
61/418,850	1 December 2010 (01.12.2010)	US
61/426,425	22 December 2010 (22.12.2010)	US

(71) Applicant *(for all designated States except AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR, US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(71) Applicant *(for AL, AT, BE, BG, CH, CN, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IN, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR only)*: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG** [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ATWAL, Jasvinder** [CA/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **CHEN, Yongmei** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **CHIU, Cecilia Pui Chi** [CA/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **LAZARUS, Robert A.** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **WANG, Weiru** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **WATTS, Ryan J.** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **WU, Yan** [US/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US). **ZHANG, Yingnan** [CN/US]; c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(74) Agents: **HEIDER, Julie A.** et al.; Genentech, Inc., 1 DNA Way, MS49, South San Francisco, California 94080 (US).

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

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

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(88) Date of publication of the revised international search report:
5 July 2012

(15) Information about Correction:
see Notice of 5 July 2012

WO 2012/064836 A9

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

(57) Abstract: The invention provides antibodies to specific neural proteins and methods of using the same.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisoria Estadounidense N° 61/456.642 presentada el 10 de noviembre, 2010, Solicitud Provisoria Estadounidense N° 61/418.310, presentada el 30 de noviembre, 2010, Solicitud Provisoria Estadounidense N° 61/418.850, presentada el 1 de diciembre, 2010 y Solicitud Provisoria Estadounidense N° 61/426.425, presentada el 22 de diciembre, 2010, todas estas solicitudes son incorporadas a la presente en su totalidad a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en general, a anticuerpos los cuales son antagonistas de BACE1 que, por ejemplo, inhiben o disminuyen la actividad de BACE1 y a composiciones que comprenden ese tipo de anticuerpos. Las realizaciones adicionales incluyen métodos para tratar y diagnosticar diversas enfermedades o trastornos neurológicos, así como también métodos para reducir APP y/o polipéptidos Aβ en un paciente.

ANTECEDENTES

La amiloidosis no es una única entidad patológica sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedad progresivos caracterizados por depósitos tisulares extracelulares de una proteína del tipo almidón, cerosa denominada amiloide, la cual se acumula en uno o más órganos o sistemas del cuerpo. A medida que los depósitos de amiloides se acumulan, los mismos comienzan a interferir con la función normal del órgano o sistema del cuerpo. Existen por lo menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son amiloidosis primaria sin antecedente conocido, amiloidosis secundaria luego de alguna otra afección, y amiloidosis hereditaria.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en proteínas del tipo amiloide, o están asociadas con las mismas, y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de amiloide o material del tipo amiloide que contribuyen con la patogénesis, así como también con el progreso de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, aunque sin limitarse a, trastornos neurológicos tales como la Enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo

Holandés); El complejo Guam Parkinson–Demencia. Otras enfermedades las cuales se basan en proteínas del tipo amiloide, o que están asociadas con las mismas, son parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ALS (esclerosis lateral amiotrópica), Diabetes de Inicio en el Adulto, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, incluyendo degeneración macular.

El polipéptido β–amiloide (Aβ) probablemente juegue un rol central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA). Vassar *et al.*, *J. Neurosci.* 29:12787–12794 (2009). La acumulación de polipéptido Aβ en el SNC da como resultado disfunción sináptica, degeneración de axones y muerte neuronal. Los cerebros de pacientes con EA muestran una patología característica de lesiones neuropatológicas prominentes, tales como enmarañamientos neurofibrilares (NFTs, por sus siglas en inglés), y placas seniles ricas en amiloide. El componente principal de las placas amiloides es Aβ. Estas lesiones están asociadas con la pérdida masiva de poblaciones de neuronas del sistema nervioso central (SNC) y su progresión acompaña la demencia clínica asociada con la EA.

Aβ es el producto proteolítico de la proteína precursora, proteína precursora del beta amiloide (β–APP o APP). APP es una proteína trans–membrana tipo I la cual es secuencialmente disociada por dos proteasas, una β– y γ–secretasa. La β–secretasa, conocida como enzima 1 de disociación de proteína precursora del amiloide de sitio β (BACE1, por sus siglas en inglés), disocia en primer lugar APP para exponer al término N de Aβ, produciendo de ese modo un fragmento unido a membrana conocido como C99. Vassar *et al.*, *J. Neurosci.*, 29:12787–12794 (2009) y UniProtKB/Swiss–Prot Entry P56817 (BACE1_HUMAN). Luego, la γ–secretasa es capaz de disociar C99 para producir el polipéptido Aβ maduro. Aβ es producido con terminales C heterogéneas que oscilan en longitud de 38 aminoácidos a 43 aminoácidos. La forma de 42 aminoácidos de Aβ ($A\beta_{42}$) es la forma fibrilogénica de Aβ y es producida en exceso en pacientes con síndrome de Down y se ha sugerido que juega un rol en la patogénesis temprana de EA. Vassar *et al.*, *J. Neurosci.* 29:12787–12794 (2009). Por ende, BACE1 se ha convertido en un objetivo terapéutico ya que su inhibición inhibiría supuestamente la producción de APP y Aβ.

De hecho, los ratones con inactivación de BACE1 ($BACE1^{-/-}$) no producen Aβ cerebral, lo cual confirma que BACE1 es la principal, sino la única, enzima responsable de producir Aβ en el cerebro. Roberds *et al.*, *Human Mol. Genetics*

10:1317–1324 (2001). Asimismo, ratones con inactivación de BACE1 en modelos de EA no forman placas amiloides; los defectos cognitivos y disfunción colinérgica son rescatados también. McConlogue *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 26326–26334 (2007); Ohno *et al.*, *Neuron* 41: 27–33 (2004); y Laird *et al.*, *J. Neurosci.* 25:11693–11709 (2005). Adicionalmente, ratones con inactivación heterocigóticos de BACE1 tienen formación de placas reducida lo cual indica que la completa inhibición de la actividad de BACE1 no es necesaria para la reducción de placas. McConlogue *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282: 26326–26334 (2007).

Recientemente, se ha demostrado que APP es un ligando para el Receptor de Muerte 6 ("Death Receptor 6") (DR6) el cual activa la muerte de cuerpos de células neuronales dependientes de caspasa y reinervación colateral (*pruning*) de axones. Nikolaev *et al.*, *Nature* 457: 981–989 (2009). Por añadidura, un inhibidor de compuesto de BACE1 menoscabó la degeneración de axones y cuerpos celulares. *Id.* Estos resultados apunta a un modelo en el cual APP, por medio de la unión a DR6 puede contribuir con la EA.

Sería beneficioso tener un inhibidor terapéutico eficaz de BACE1 para reducir la producción de APP y Aβ en pacientes con enfermedades y trastornos neurológicos, tales como la EA. La invención proporcionada en la presente solicitud se relaciona con ese tipo de inhibidores, incluyendo su uso en una variedad de métodos.

Todas las referencias citadas en esta solicitud, incluyendo las solicitudes de patentes y publicaciones, son incorporadas como referencia en su totalidad.

SÍNTESIS

La invención proporciona anticuerpos antagonistas de BACE1 y métodos para su utilización. Específicamente, los anticuerpos inhiben o reducen la actividad de BACE1.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1, donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1. En particular, el anticuerpo se une al sitio activo de BACE1 o a un exositio de BACE1.

En otra realización, se provee un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende por lo menos una secuencia de región hipervariable (HVR, por sus siglas en inglés) seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 7–19, 22–26, 28–30, 35–47, 56–79 y 118–122.

En una realización adicional, un anticuerpo aislado que se une a BACE1 es proporcionado donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GFX_{30}FX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}IH$ (SEC ID NO: 45), donde X_{30}=N o T; X_{31}=S, L o Y; X_{32}=G o Y; X_{33}=Y o S; y X_{34}=A, G o S; HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{35}X_{36}ISPX_{37}X_{38}GX_{39}TX_{40}YADSVKG$ (SEC ID NO: 46), donde X_{35}=A o G; X_{36}=W o S; X_{37}=A o Y; X_{38}=G o S; X_{39}=S o Y; y X_{40}=D o S; y HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ $X_{47}MDY$ (SEC ID NO: 47), donde X_{41}=Q o G; X_{42}=T o F; X_{43}=H o S; X_{44}=Y o P; X_{45}=Y o W; X_{46}=Y o V y donde X_{47} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48). Alternativamente, el anticuerpo comprende una secuencia HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos $GFTFX_{13}GYX_{14}IH$ (SEC ID NO: 26), donde X_{13}=S o L y X_{14}=A o G; o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 22; SEC ID NO: 23; y SEC ID NO: 28.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEC ID NO: 120), donde X_{71}=F o Y; X_{72}=F, N o T; X_{73}=F o Y; X_{74}=L, Q, I, S o Y; X_{75}=G o Y; X_{76}=Y o S; y X_{77}=A, G o S; HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVKG$ (SEC ID NO: 121), donde X_{78}=A o G; X_{79}=W o S; X_{80}=A, S, Q o Y; X_{81}=G o S; X_{82}=S, K, L o Y; X_{83}=T o Y; y X_{84}=D o S; y HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEC ID NO: 122), donde X_{85}=Q o G; X_{86}=T o F; X_{87}=H, Y o S; X_{88}=Y o P; X_{89}=Y o W; X_{90}=Y o V y donde X_{91} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48). Alternativamente, el anticuerpo comprende una secuencia de HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (SEC ID NO: 68), donde X_{53}=F o Y; X_{54}=T o F; X_{55}=F o Y; X_{56}=L, Q o I; o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 71–73. Alternativamente, el anticuerpo comprende una secuencia de HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos $GWISPX_{57}X_{58}GX_{59}X_{60}DYADSVKG$ (SEC ID NO: 69), donde X_{57}=A, S o Q; X_{58}=G o S; X_{59}=S, K o L; X_{60}=T o Y; o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 74–78. Alternativamente, el anticuerpo comprende una secuencia de HVR–H3

que comprende la secuencia de aminoácidos GPFX_{61}PWVMDY (SEC ID NO: 70), donde X_{61}=S o Y; o una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 79.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 23, SEC ID NO: 28 y SEC ID NOs: 71–73.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 24, SEC ID NO: 29 y SEC ID NOs: 74–78.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 25, SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 79.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende secuencias HVR–H1, HVR–H2, y HVR–H3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(B) o aquellas expuestas para los clones Fab12, LC6, LC9 y LC10 en la Figura 2(B) o aquellos clones expuestos en las Figuras 24A–C .

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 de SEC ID NO: 22 o 23, una secuencia de HVR–H2 de SEC ID NO: 24 y una secuencia de HVR–H3 de SEC ID NO: 25. En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 de SEC ID NO: 23, una secuencia de HVR–H2 de SEC ID NO: 24 y una secuencia de HVR–H3 de SEC ID NO: 25. En aun otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 de SEC ID NO: 28, una secuencia de HVR–H2 de SEC ID NO: 29, y una secuencia de HVR–H3 de SEC ID NO: 30.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 seleccionada entre SEC ID NOs: 71–73, una secuencia de HVR–H2 seleccionada entre SEC ID NOs: 74–78 y una secuencia de HVR–H3 seleccionada entre SEC ID NO: 79.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una cadena pesada variable (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 20, 21, 27 y 80–98. En un aspecto, el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de cadena VH de SEC ID NO: 21.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEC ID NO: 42), donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{22}ASX_{23}LYS$ (SEC ID NO: 43), donde X_{22}=S, W, Y o L; X_{23}=F, S o W, y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}T$ (SEC ID NO: 44), donde X_{24}=S, F, G, D o Y; X_{25}=Y, P, S o A; X_{26}=Y, T o N; X_{27}=T, Y, D o S; X_{28}=P o L; y X_{29}=F, P o T.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEC ID NO: 42), donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{62}ASX_{63}X_{64}YX_{65}$ (SEC ID NO: 118), donde X_{62}=S, W, Y, F o L; X_{63}=F, S, Y o W; X_{64}=L o R; X_{65}=S, P, R, K o W, y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}T$ (SEC ID NO: 119), donde X_{66}=S, F, G, D o Y; X_{67}=Y, P, S o A; X_{68}=Y, T o N; X_{69}=T, Y, D o S; X_{70}=P, Q, S, K o L; y X_{71}=F, P o T.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A;

X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 o SEC ID NO: 35.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos X_6ASFLYS (SEC ID NO: 18), donde X_6=S o L o X_{15}ASX_{16}LYS (SEC ID NO: 41), donde X_{15}=S, W o Y e X_{16}=S o W o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, y SEC ID NOs: 36–39.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQ$X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$T (SEC ID NO: 19), donde X_7=S, F, G, D o Y; X_8=Y, P, S, o A; X_9=T o N; X_{10}=T, Y, D o S; X_{11}=P o L; X_{12}=P o T o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 11–16 y SEC ID NO: 40.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQX_1V$X_2X_3X_4X_5$A (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A; X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 7.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos X_{48}AS$X_{49}X_{50}$YX_{51} (SEC ID NO: 56), donde X_{48}=S o F; X_{49}=F o Y; X_{50}=L o R; X_{51}=S, P, R, K o W o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 58–64.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQFPTYX_{52}PT (SEC ID NO: 57), donde X_{52}=L, Q, S o K o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 65–67.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1

y comprende las secuencias HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(A) o aquellas expuestas para los clones Fab12, LC6, LC9 y LC10 en la Figura 2(A) o aquellas expuestas para los clones en la Figura 23A–C.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–L1 de SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8; una secuencia de HVR–L2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10 o SEC ID NOs: 58–64; y una secuencia de HVR–L3 seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NOs: 11–16 y 65–67. En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–L1 de SEC ID NO: 7, una secuencia de HVR–L2 de SEC ID NO: 9 y una secuencia de HVR–L3 de SEC ID NO: 12.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–L1 de SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 o SEC ID NO: 35.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–L2 de SEC ID NOs: 9–10, 36–39 o 58–64.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–L3 de SEC ID NOs: 11–16, 40 o 65–67.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de cadena liviana variable (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NOs: 1–6, 31–34 y 99–117. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de cadena VL es SEC ID NO: 2.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una secuencia de HVR–H1 de SEC ID NO: 23, una

secuencia de HVR–H2 de SEC ID NO: 24, una secuencia de HVR–H3 de SEC ID NO: 25, una HVR–L1 de SEC ID NO: 7, una HVR–L2 de SEC ID NO: 9 y una HVR–L3 de SEC ID NO: 12.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a BACE1 donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido de BACE1 y comprende una cadena VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 y una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 21.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado el cual se une a un epítopo que comprende por lo menos uno de los residuos aminoácidos de BACE1 seleccionado del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 que comprende los aminoácidos: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

En otras realizaciones, el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 que comprende por lo menos una región de aminoácido de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 315–318 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 331–335 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 370–381 de SEC ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 que comprende los aminoácidos 315–318, 331–335 y 370–381 de SEC ID NO: 49.

En otra realización el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 lo cual da como resultado un cambio conformacional en la estructura de los sitios P6 y P7 de BACE1 luego de la unión. En una realización adicional, el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 lo cual induce a que los aminoácidos 218–231 de SEC ID NO: 49 adopten una estructura de lazo aleatoria.

Un anticuerpo de la invención puede estar en cualquier cantidad de formas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico. En otros aspectos el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo (*por ej.,* un fragmento que comprende un componente de unión al antígeno). En otros aspectos de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención puede estar ligado o conjugado a un agente o resto, por ej., un agente citotóxico, para crear un inmunoconjugado.

En una realización, se proporciona una formulación farmacéutica la cual comprende un anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones adicionales se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención, así como también un vector que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención así como también métodos para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención bajo condiciones adecuadas para la producción del anticuerpo.

En otra realización, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

En una realización adicional, se proporciona un método para reducir las placas de amiloides, o inhibir la formación de placas de amiloides en un paciente que sufre de, o que corre riesgo de contraer, una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

En una realización, un método para reducir la proteína A□ en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. En un aspecto, el paciente está padeciendo una enfermedad o trastorno neurológico o corre riesgo de contraer una enfermedad o trastorno de ese tipo.

En otra realización, se proporciona un método para inhibir la degeneración de axones en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención.

En una realización adicional, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno neurológico en un paciente que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de la invención bajo condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un polipéptido de BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido de BACE1.

En una realización, se proporciona un método para determinar si un paciente es elegible para terapia con un anticuerpo anti–BACE1, que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de la invención bajo condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un

polipéptido de BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido de BACE1, donde la presencia de un complejo entre el anticuerpo y BACE1 es indicativa de un paciente que puede ser elegido para terapia con un anticuerpo anti–BACE1. En un aspecto, el paciente está sufriendo de una enfermedad o trastorno neurológico o corre riesgo de contraer ese tipo de enfermedad o trastorno.

En un aspecto, las muestras biológicas que pueden ser empleadas en el diagnóstico de una enfermedad o afección neurológica; o para pronosticar la capacidad de respuesta, o determinar la elegibilidad, de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo contra BACE1 incluyen, aunque sin limitarse a, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, moco, fluido cerebroespinal, fluido linfático y similares o muestras de tejido o célula obtenidas de un organismo tal como tejido neuronal, cerebral, cardíaco o vascular.

En un aspecto de los métodos de la invención, el paciente es un mamífero. En otro aspecto, el paciente es un ser humano. En otro aspecto, la enfermedad o trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, glaucoma, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Paget, lesión cerebral traumática, Enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear, encefalopatía espongiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, insomnio fatal familiar, parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cereoidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, Síndrome del pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome Halervorden–Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch–Nyhan, y síndrome de Unverricht–Lundborg, demencia (incluyendo, aunque sin limitarse a, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelosa). En un aspecto, la enfermedad o trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer.

En una realización, se proporciona un epítopo de BACE1 el cual es específicamente reconocido por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende por lo menos uno de los residuos aminoácidos de BACE1 que

corresponden a los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49. En un aspecto, el epítopo de BACE1 comprende aminoácidos los cuales corresponden a 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRY; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

En una realización, un epítopo de BACE1 el cual es específicamente reconocido por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende por lo menos una región aminoácida de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 315–318 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 331–335 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 370–381 de SEC ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el epítopo de BACE1 comprende aminoácidos 315–318, 331–335 y 370–381 de SEC ID NO: 49.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A–1B ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena liviana y pesada del clon YW412.8 obtenido de una especie naïve de la genoteca de exhibición de fagos de diversidades naturales y formas maduradas por afinidad de YW412.8 según lo descrito en el Ejemplo 1(A). La Figura 1A ilustra las alineaciones de secuencias de cadena liviana. La Figura 1B ilustra las alineaciones de secuencias de cadena pesada. En ambas Figuras 1A y 1B, las secuencias de HVR para cada clon están indicadas por las regiones en recuadros, indicando el primer recuadro HVR–L1 (SEC ID NOs: 7 y 8 – Figura 1A) o HVR–H1 (SEC ID NOs: 22 y 23 – Figura 1B), indicando el segundo recuadro HVR–L2 (SEC ID NOs: 9 y 10 – Figura 1A) o HVR–H2 (SEC ID NO: 24 – Figura 1B), e indicando el tercer recuadro HVR–L3 (SEC ID NOs: 11–16 – Figura 1A) o HVR–H3 (SEC ID NO: 25 – Figura 1B).

Las Figuras 2A–2B ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena liviana y pesada del clon Fab 12 obtenido de una clase naïve de una genoteca de exhibición de fagos de diversidades sintéticas y formas maduradas por afinidad de Fab 12, según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La Figura 2A ilustra las alineaciones de secuencias de cadena liviana. La Figura 2B ilustra las alineaciones de secuencias de cadena pesada. En ambas Figuras 2A y 2B, las secuencias de HVR para cada clon están indicadas por las regiones con recuadros, indicando el primer recuadro HVR–L1 (SEC ID NO: 35 – Figura 2A) o HVR–H1 (SEC ID NO: 28 – Figura 2B), indicando el segundo recuadro HVR–L2 (SEC ID NOs: 36–39 – Figura 2A) o HVR–H2 (SEC ID NO: 29 – Figura 2B), e indicando el tercer recuadro HVR–L3 (SEC ID NO: 40 – Figura 2A) o HVR–H3 (SEC ID NO: 30 – Figura 2B).

Las Figuras 3A y 3B ilustran las secuencias de HVR o CDR de los Fabs de cadena liviana y pesada aislados de la genoteca de exhibición de fagos de diversidades sintéticas según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La numeración es acorde a la nomenclatura de Kabat *et al.* La Figura 3A describe las secuencias "CDRL1" como SEC ID NO: 133, las secuencias "CDRL2" como SEC ID NO: 134, las secuencias "CDRL3" como SEC ID NOS 135–144, 141, y 145–152, y las secuencias "CDRH1" como SEC ID NOS 153–159, 158, 160–161, 159, 158, 162, 161, y 163–167, todas respectivamente, en orden de aparición. La Figura 3B ilustra las secuencias "CDRH2" como SEC ID NOS 168–177, 174, 171, 178–182, 177, y 183, y las secuencias "CDRH3" como SEC ID NOS 184–202, todas, respectivamente, en orden de aparición.

La Figura 4 proporciona un gráfico que muestra la inhibición de BACE1 mediante los diversos clones identificados de las genotecas de exhibición de fagos de diversidades naturales y diversidades sintéticas. Los clones fueron analizados para determinar la inhibición de BACE1 en un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF, por sus siglas en inglés) homogéneo, según lo descrito en el Ejemplo 1(A). Los anticuerpos de serie YW fueron empleados a una concentración de 500 nM excepto por el anticuerpo YW 434.6, el cual fue analizado a una concentración de 320 nM. Los anticuerpos 12.IgG, 14.IgG LC6.IgG, LC9.IgG, LC10.IgG y LC11.IgG fueron analizados a una concentración de 1 µM.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad de BACE1 en un ensayo de HTRF en presencia de Fabs anti–BACE1 identificados de la genoteca de exhibición de fagos de diversidades sintéticas, según lo descrito en el Ejemplo 1(B). Las líneas corresponden a 100% de actividad (0% de inhibición) en presencia de BACE1 y sustrato (Control de PBS) y 100% de inhibición en ausencia de BACE1.

La Figura 6 ilustra las secuencias CDR o HVR de Fabs anti–BACE1 madurados por afinidad según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La numeración es acorde con la nomenclatura de Kabat *et al.* La relación de ELISA por competición es la relación de la señal de ELISA en ausencia o presencia de 20 nM de BACE1 como competidor en solución en ensayos ELISA de competición de un punto según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La Figura 6 describe las secuencias "CDRL1" como SEC ID NOS 133, 133, 133, 133, 133, y 203, las secuencias "CDRL2" como SEC ID NOS 134, 134, y 204–207, las secuencias "CDRL3" como SEC ID NOS 208–209, 145, 145, y 145–146, las secuencias "CDRH1" como SEC ID NOS 157, 157, 158, 158, 158, y 162, las secuencias "CDRH2" como SEC ID

NOS 172, 172, 171, 171, 171, y 178, y las secuencias "CDRH3" como SEC ID NOS 188, 188, 195, 195, y 195–196, todas, respectivamente, en orden de aparición.

Las Figuras 7A-7C contienen gráficos que muestran datos de ensayos ELISA competitivos con clones anti–BACE madurados por afinidad según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La unión entre fago que exhibe Fab y BACE1 inmovilizada sobre placas se compitió con dilución seriada de BACE1 en solución. Las Figuras 7A, 7B y 7C ilustran curvas de competición para los anticuerpos progenitores y correspondientes anticuerpos madurados por afinidad.

Las Figuras 8A-8C ilustran gráficos que muestran la inhibición de BACE1 con Fabs anti–BACE1 en un ensayo de enzima HTRF según lo descrito en el Ejemplo 1(B). La actividad de inhibición de Fabs purificados para clones anti–BACE1 individuales se midió en un ensayo de enzimas HTRF. OM99–2 (CalBiochem®, catálogo #496000), es un inhibidor peptídico sintético para BACE1 y se utilizó como un control positivo. Las Figuras 8A, 8B y 8C son curvas de inhibición para los derivados progenitores y correspondientes derivados madurados por afinidad. La IC_{50} para OM99–2 fue 11nM en este ensayo.

La Figura 9A proporciona un gráfico que muestra el impacto del anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 madurado por afinidad sobre la actividad enzimática *in vitro* de BACE1 recombinante humana utilizando ya sea un sustrato peptídico largo con mayor susceptibilidad a BACE1 en un ensayo HTRF (panel izquierdo) o un sustrato peptídico corto con mayor susceptibilidad a BACE1 en un ensayo FRET (panel derecho), según lo descrito en el Ejemplo 2(B). OM99–2 (CalBiochem®, catálogo #496000), un inhibidor peptídico sintético de BACE1, inhibidor IV de β–Secretasa (CalBiochem®, catálogo #565788), un inhibidor de molécula pequeña de BACE1 (BACE1 SMI) y un anticuerpo IgG el cual no se une a BACE1 se emplearon como controles. Las Figuras 9B1 y 9B2 también proporcionan gráficos que muestran la actividad enzimática *in vitro* de dominio extracelular de BACE1 recombinante humana, dominio extracelular de BACE2 recombinante humana o el dominio extracelular de catepsina D sobre un sustrato peptídico corto con mayor susceptibilidad a BACE1 en presencia de YW412.8.31, o un anticuerpo IgG control según lo descrito en el Ejemplo 2(B).

La Figura 10 ilustra los resultados de experimentos realizados con diversos anticuerpos anti–BACE1 (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 y YW412.8.51) sobre el procesamiento de proteína precursora del amiloide (APP)

recombinante en células 293–HEK, según lo descrito en el Ejemplo 2(C). Se empleó como control un anticuerpo IgG el cual no se une a BACE1 (Xolair®).

Las Figuras 11A-11D proporcionan gráficos que ilustran los efectos del anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 sobre el procesamiento de proteína precursora del amiloide (APP) recombinante o endógena, según lo descrito en el Ejemplo 2(C). La Figura 11A muestra los resultados de experimentos que utilizan células 293–HEK que expresan establemente APP humana tipo salvaje. SMI de BACE1 es un inhibidor de BACE1 de molécula pequeña el cual fue empleado como un control (Compuesto 8e – Charrier *et al.*, *J. Med. Chem.* 51:3313–3317 (2008). La Figura 11B muestra los resultados de experimentos que emplean neuronas ganglionares de raíz dorsal E13.5 cultivadas de ratones CD1 tipo salvaje. Se realizaron experimentos adicionales empleando cultivos de neuronas corticales E16.5 (Figura 11C) y neuronas de hipocampo cultivadas E16.5 (Figura 11D) de ratones CD1 tipo salvaje.

Las Figuras 12A–12C proporcionan imágenes de la captación de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 en neuronas de ratón primarias, según lo descrito en el Ejemplo 2(D). La Figura 12A muestra la internalización de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 en vesículas intracelulares en neuronas. Las neuronas corticales embriónicas fueron incubadas a 37°C durante los tiempos indicados. Se detectó YW412.8.31 unido sobre compartimientos celulares de superficie (no permeabilizados) o internos (permeabilizados) con α–humana–Alexa 568. La mayoría de la señal fue internalizada. YW412.8.31 internalizado fue localizado en compartimientos subcelulares por co–tinción con los marcadores indicados para compartimientos vasculares: endosomas tempranos (TfR); red trans–golgi (VAMP4) y lisosoma (LAMP1). Barra de escala =65 μm (parte superior) y 20 μm (parte inferior). La Figura 12B muestra la captación de anticuerpo anti–BACE1 en neuronas ganglionares de raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) E13.5 a dos temperaturas diferentes y tres puntos temporales diferentes, según lo indicado en la Figura. Las células fueron permeabilizadas para permitir el etiquetado de anticuerpo BACE1 intracelular. Solamente anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 unido externamente es etiquetado e las células no permeabilizadas. La Figura 12(C) muestra la captación en neuronas corticales E16.5 de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 de ratones que expresan BACE1 o con inactivación de BACE1.

La Figura 13 proporciona una representación gráfica de resultados de ELISA del Ejemplo 3(A), que compara la unión competitiva de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8, consigo mismo, otro anticuerpo anti–BACE1 (LC6), un péptido de unión a BACE1 de sitio activo (OM99–2 (CalBiochem®, catálogo #496000)) y un péptido de unión a BACE1 de exositio (BMS1) (Péptido 1 en Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567–11572 (2005)).

La Figura 14 muestra diferentes vistas de la estructura de 2.8 Å del Fab YW412.8.31 cocristalizado con el dominio extracelular de BACE1 humano según lo descrito en el Ejemplo 3(B). El Fab se une a un exositio de BACE1 distantes del sitio activo de secretasa, que se superpone parcialmente con otro exositio que se sabe que interactúa con ciertos péptidos que tienen propiedades inhibidoras de BACE1.

La Figura 15 proporciona una vista de acercamiento de la interacción del Fab YW412.8.31 con el dominio extracelular de BACE1 humano. BACE1 se muestra en representación superficial y el Fab se muestra como cintas. La superficie punteada indica el epítopo de BACE1.

Las Figuras 16A y 16B muestran los resultados de experimentos para examinar la contribución de BACE1 aniveles de $A\beta_{1-40}$ en ratones del tipo salvaje. Se examinaron los niveles de $A\beta_{1-40}$ en ratones BACE1+/+ vs. BACE1–/–. Los ratones recibieron una única dosis de anticuerpo IgG control o anticuerpo anti–BACE YW412.8.31 según lo descrito en el Ejemplo 4. La Figura 16A muestra los resultados de estudios genéticos que examinan la contribución de BACE1 a la producción de $A\beta_{1-40}$ en ratones. Los niveles de $A\beta_{1-40}$ observados en ratones con inactivación de BACE1 (BACE1–/–) proporcionan un control de cómo inhibidores específicos de BACE1 alteran la producción de $A\beta_{1-40}$ en ratones del tipo salvaje. La Figura 16B muestra los efectos de la dosificación de IgG control o anti–BACE1 YW412.8.31 (50 mg/kg) sobre la producción de $A\beta_{1-40}$ en plasma y SNC (corteza) 24 o 48 horas luego de la dosificación. Se suministró una única dosis de IgG control o anticuerpo anti–BACE1 (50 mg/kg) por inyección IV a ratones C57Bl/6. 24 o 48 horas más tarde, se recolectaron muestras de plasma y cerebro para analizar $A\beta_{1-40}$. El $A\beta_{1-40}$ plasmático es reducido en 35% (a 24 hr) y $A\beta_{1-40}$ cortical en ~20%. Los valores trazados son medias (±SEM) * $p<0.01$; ** $p<0.001$.

Las Figuras 17A–17B proporcionan resultados de los experimentos con anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 *in vivo* descritos en el Ejemplo 4. La Figura 17A muestra trazados de los niveles de $A\beta_{1-40}$ observados en el plasma y el

hipocampo de ratones tratados con el anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 en dos concentraciones diferentes en comparación con el tratamiento control con vehículo. La Figura 17B es un trazado de lecturas farmacodinámicas en comparación con lecturas farmacocinéticas individuales, que indican que existe una relación PK/PD en este modelo de ratón para el anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31.

Las Figuras 18A y 18B muestran una comparación de experimentos en los cuales los ratones transgénicos hAPP recibieron dosis de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 sistémicamente (Panel A, mismo experimento según lo descrito en la Figura 17A regraficada para comparación) o por infusión ICV continua (Panel B). En la Figura 18A, los animales recibieron vehículo o anticuerpo anti–BACE1 (30 o 100 mg/kg) por inyección IP (3 dosis @ Q4D). 2 Horas después de la última dosis, se recolectaron muestras de plasma y cerebro para analizar $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$. Los $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ plasmáticos fueron reducidos hasta ~30% de los niveles controles en ambos 30 y 100 mg/kg de anticuerpo anti–BACE1. $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ de hipocampo se redujeron (13–22%) mediante la dosis elevada de anti–BACE1 (100 mg/kg), y $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ cortical mostraron una tendencia hacia la reducción (12–18%). En la Figura 18B, se administró anticuerpo IgG control o anti–BACE1 por infusión ICV unilateral durante 7 días. Se observaron reducciones consistentes en $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ en ambas dosis en corteza (15–23%) y en hipocampo (15–20%). El Panel C muestra los niveles de anticuerpo anti–BACE1 en el cerebro luego de la administración sistémica vs. ICV. Los valores trazados son medias (±SEM) * $p<0.05$; ** $p<0.001$

Las Figuras 19A y 19B muestran el análisis de PK de una única dosis de YW412.8.31 anti–BACE1 (1 o 10 mg/kg) administrada por medio de inyección IV a ratones BALB/C (Figura 19A). Se analizó PK sérica a los 21 días posteriores a la dosis. Se emplearon dos ensayos PK separados: un ensayo para detectar todo el anti–BACE1 en suero (mAb total), y un ensayo para detectar solamente anti–BACE1 no unido en suero (mAb libre). El análisis de PK de una sola dosis en ratones BACE1+/+, BACE1+/–, y BACE1–/– confirma la no linealidad observada en el estudio inicial e indica que la mayor evacuación ("clearance") es de hecho mediada por el objetivo (Figura 19B).

Las Figuras 20A y 20B muestran el análisis PK de monos Cynomolgus dosificados con IgG control o anticuerpo YW412.8.31 anti–BACE1 (30 mg/kg) por administración IV. Las concentraciones de anticuerpo anti–BACE1 o control total

en muestras de suero de mono (Figura 20A) y CSF (Figura 20B) se midieron utilizando anticuerpo policlonal IgG antihumano de cabra adsorbido por mono (Betil, Montgomery, TX) según lo descrito en el Ejemplo 5.

Las Figuras 21A-21D son los resultados de experimentos según lo descrito en el Ejemplo 5 en los cuales monos Cynomolgus recibieron dosis de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 o IgG control por administración IV. Las líneas sombreadas muestran datos para animales individuales y las líneas sólidas muestran medias de grupos. Se recogieron muestras de Plasma y CSF 7 días, 2 días y justo antes de la dosificación para fijar un valor medio para los niveles de punto de partida de $A\beta_{1-40}$ en cada mono individual. Se midió $A\beta_{1-40}$ plasmático (Figura 21A) y $A\beta_{1-40}$ de CSF (Figura 21B) en diversos tiempos. También se muestra la variabilidad a través de animales en $A\beta_{1-40}$ plasmático (Figura 21C) y CSF (Figura 21D) en el punto de partida.

Las Figuras 22A y 22B ilustran la producción de Aβ luego de la dosificación sistémica de YW412.8.31 en ratones del tipo salvaje. La Figura 22A es un gráfico que muestra la producción de $A\beta_{1-40}$ después de una sola dosis de IgG control o YW412.8.31 (100 mg/kg) administrado por inyección IP a ratones C57Bl/6J. 4 horas más tarde, se recogieron muestras plasmáticas y cerebrales para analizar $A\beta_{1-40}$. El $A\beta_{1-40}$ plasmático es reducido en 48%, pero $A\beta_{1-40}$ de prosencéfalo no es reducido en este paradigma. La Figura 22B es un gráfico que muestra la producción de $A\beta_{1-40}$ luego de la administración de IgG control o YW412.8.31 (30 o 100 mg/kg) por 3 inyecciones IP, espaciadas una de la otra por 4 días. 4 Horas después de la última dosis, se recogieron muestras plasmáticas y cerebrales para analizar $A\beta_{1-40}$. Se reduce el $A\beta_{1-40}$ plasmático en 50–53%, mientras que el $A\beta_{1-40}$ del prosencéfalo no es reducido por dosificación a 30 mg/kg, pero es reducido en 42% cuando se dosifica a 100 mg/kg. Los valores trazados son media (±SEM) * $p<0.0001$

Las Figuras 23A–23C ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena liviana de clon YW412.8.31 y las formas maduradas por afinidad de YW412.8.31. Las Figuras 23A–23C ilustran las alineaciones de secuencias de cadena liviana completas. Las secuencias HVR para cada clon son indicadas por las regiones en recuadro, indicando el primer recuadro HVR–L1 (SEC ID NO: 7 – Figura 23A), indicando el segundo recuadro HVR–L2 (SEC ID NOs: 9 y 58–64 – Figura 23), e indicando el tercer recuadro HVR–L3 (SEC ID NOs: 12 y 66–67 – Figura 23C).

Las Figuras 24A–24C ilustran las secuencias de aminoácidos de cadena pesada del clon YW412.8.31 y las formas maduradas por afinidad de YW412.8.31. Las Figuras 24A–24C ilustran las alineaciones de secuencias de cadena pesada completa. Las secuencias HVR para cada clon están indicadas por las regiones encuadradas, indicando el primer recuadro HVR–H1 (SEC ID NOs: 24 y 71–73 – Figura 24A), indicando el segundo recuadro HVR–H2 (SEC ID NOs: 24 y 74–78 – Figura 24B), e indicando el tercer recuadro HVR–H3 (SEC ID NOs: 25 y 79 – Figura 24C).

Las Figuras 25A y B ilustran los gráficos que muestran la inhibición de BACE1 con YW412.8.31 y los clones madurados por afinidad en un ensayo de HTRF según lo descrito en el Ejemplo 6. Se analizó la capacidad de los clones YW412.8.31.3S; YW412.8.31.9S; YW412.8.31.25S; YW412.8.31.58S; YW412.8.31.53; YW412.8.31.69; YW412.8.31.77; YW412.8.31.81S y YW412.8.31.89S para inhibir la actividad de proteasa de BACE1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

I DEFINICIONES

Una estructura humana aceptora" para los propósitos de la presente invención es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable (VL) de cadena liviana o una estructura de dominio variable (VH) de cadena pesada derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana, según lo definido más adelante. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, la cantidad de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas realizaciones, la estructura humana aceptora VL es idéntica en secuencia a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana VL o secuencia de estructura de consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la resistencia de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (*por ej.,* un anticuerpo) y su socio de unión (*por ej.,* un antígeno). A menos que se indique lo contrario, en el presente contexto, "afinidad de unión" se refiere a una afinidad de unión intrínseca la cual refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión

(*por ej.,* anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su socio Y puede generalmente ser representada por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en esta invención. Las realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVRs), en comparación con un anticuerpo progenitor el cual no posee ese tipo de alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Los términos "anticuerpo anti–beta–secretasa", "anticuerpo anti–BACE1", "un anticuerpo que se une a beta–secretasa" y "un anticuerpo que se une a BACE1" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a BACE1 con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo es útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento hacia BACE1. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo anti–BACE1 a una proteína no BACE1 no relacionada es inferior a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a BACE1 según lo medido, *por ej.,* por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a BACE1 tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, o ≤ 0.001 nM (por ej. 10^{-8} M o menos, por ej. entre 10^{-8} M y 10^{-13} M, *por ej.,* entre 10^{-9} M y 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti–BACE1 se une a un epítopo de BACE1 que es conservado entre BACE1 de diferentes especies e isoformas.

El término "anticuerpo" en la presente invención se emplea en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo aunque sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*por ej.,* anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad de unión al antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula que no es un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual el anticuerpo intacto se une. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen aunque sin limitarse a Fv, Fab, Fab', Fab'–SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineares; moléculas de anticuerpos de cadena única (por

ej. scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más, y a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en 50% o más. En la presente invención se proporciona un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o liviana es derivada de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana es derivado de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de éstos pueden ser divididos adicionalmente en subclases (isotipos), *por ej.*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente.

El término "agente citotóxico" en el presente contexto se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, aunque sin limitarse a, isótopos radiactivos (*por ej.*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (*por ej.*, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, vegetal o animal, incluyendo sus fragmentos y/o variantes; y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos más adelante.

"Funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés);

unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación descendente de receptores de superficie celular (por ej., receptor de células B); y activación de células B.

Una "cantidad eficaz" de un agente, *por ej.,* una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "región Fc" en la presente se emplea para definir una región de terminal C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el término carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina de terminal C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en esta invención, la numeración de residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es acorde al sistema de numeración EU, también denominado el índice EU, según lo descrito en Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health (Instituto Nacional de Salud), Bethesda, MD, 1991.

"Estructura" o "FR" se refiere a residuos de dominios variables que no son residuos de región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3, y FR4. Por lo tanto, las secuencias HVR y FR en general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1–H1(L1)–FR2–H2(L2)–FR3–H3(L3)–FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa," "anticuerpo intacto," y "anticuerpo entero" en el presente contexto se emplean intercambiablemente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc según lo definido en la presente invención.

Los términos "célula huésped," "línea de célula huésped," y "cultivo de célula huésped " se emplean intercambiablemente y hacen referencia a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas," las cuales incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin importar la cantidad de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula

progenitora, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica a la rastreada o seleccionada en la célula originalmente transformada se incluye en esta invención.

Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Una "estructura de consenso humana" es una estructura la cual representa los residuos de aminoácidos que se presentan más comúnmente en una selección de secuencias de estructural VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, NIH Publication 91–3242, Bethesda MD (1991), Tomos 1–3. En una realización, para la VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al., supra.* En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al., supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVRs no humanas y residuos de aminoácidos de FRs humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las HVRs (*por ej.,* CDRs) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FRs corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, *por ej.,* un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sufrido humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR," en el presente contexto, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que es hipervariable en secuencia y/o forma lazos estructuralmente definidos ("lazos hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVRs; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3).

En general, HVRs comprenden residuos de aminoácidos de los lazos hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDRs, por sus siglas en inglés), siendo éstas últimas de variabilidad de secuencia más alta y/o estando involucradas en el reconocimiento del antígeno. Los ejemplos de lazos hipervariables ocurren en los residuos de aminoácidos 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2), y 96–101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–917 (1987).) Los ejemplos de CDRs (CDR–L1, CDR–L2, CDR–L3, CDR–H1, CDR–H2, y CDR–H3) se producen en residuos de aminoácidos 24–34 de L1, 50–56 de L2, 89–97 de L3, 31–35B de H1, 50–65 de H2, y 95–102 de H3. (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Con la excepción de CDR1 en VH, CDRs en general comprenden los residuos de aminoácidos que forman los lazos hipervariables. CDRs también comprenden "residuos determinantes de especificidad," o "SDRs," los cuales son residuos que contactan al antígeno. SDRs están contenidas dentro de regiones de las CDRs denominadas en forma abreviada CDRs, o a–CDRs. Los ejemplos de a–CDRs (a–CDR–L1, a–CDR–L2, a–CDR–L3, a–CDR–H1, a–CDR–H2, y a–CDR–H3) se producen en los residuos de aminoácidos 31–34 de L1, 50–55 de L2, 89–96 de L3, 31–35B de H1, 50–58 de H2, y 95–102 de H3. (Ver Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008).) A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (*por ej.,* residuos FR) están numerados en la presente invención de acuerdo con Kabat *et al., supra.*

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado a una o más moléculas heterólogas incluyendo aunque sin limitarse a un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitarse a, animales domesticados (*por ej.,* vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (*por ej.,* humanos y primates no humanos tales como monos), conejos, y roedores (*por ej.,* ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es aquel el cual ha sido separado de un componente de su medioambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo es purificado hasta más del 95% o 99% de pureza según lo determinado por, por ejemplo, análisis electroforético (*por ej.,* SDS–PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográfico (*por ej.,* intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos

para evaluar la pureza del anticuerpo, véase, *por ej.,* Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79–87 (2007).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su medioambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen comúnmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti–BACE1" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y liviana de anticuerpos (o sus fragmentos), incluyendo molécula(s) de ácido nucleico en un vector único o vectores separados, y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" en el presente contexto se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, *por ej.,* que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, dichas variantes generalmente están presentes en cantidades menores. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal es dirigida contra un solo determinante sobre un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere de la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que serán utilizados de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados mediante una variedad de técnicas, incluyendo aunque sin limitarse al método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de exhibición de fagos, y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana, dichos métodos y otros métodos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales son descritos en esta invención.

Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (*por ej.,* un resto citotóxico) o radioetiqueta. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

"Anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas al disulfuro. Del término N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1, CH2, y CH3). Similarmente, del término N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada un dominio liviano variable o un dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo puede ser asignada a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "inserto de paquete" se emplea para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de ese tipo de productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuo de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, luego de la alineación de las secuencias y de la introducción de espacios vacíos ("gaps"), en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro del conocimiento de la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles para el público tales como los programas informáticos BLAST, BLAST–2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de esta

invención, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos son generados utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN–2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN–2 fue realizado por Genentech, Inc., y se ha presentado el código de fuente con la documentación del usuario en la Oficina de Derecho de Autor Estadounidense (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el n° de Registro de Derecho de Autor Estadounidense TXU510087. El programa ALIGN–2 está disponible para el público en Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California, o puede ser compilado del código de fuente. El programa ALIGN–2 debería ser compilado para utilizar en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN–2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN–2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada con o contra una secuencia de aminoácidos B determinada (la cual puede ser alternativamente definida como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con, o contra, una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos clasificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN–2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos empleados en esta invención son obtenidos según lo descrito en el párrafo inmediatamente precedentes empleando el programa informático ALIGN–2.

El término “formulación farmacéutica" se refiere a una preparación la cual está en forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene componente adicional alguno

que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se administraría la formulación.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, que no es un ingrediente activo, el cual es no tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitarse a, un buffer, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "BACE1," en el presente contexto, se refiere a cualquier beta–secretasa 1 nativa (también denominada enzima de disociación de proteína precursora del amiloide de sitio β 1, proteasa aspártica asociada a membrana 2, memapsina 2, aspartil proteasa 2 o Asp2) de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ej. humanos) y roedores (*por ej.,* ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. El término abarca BACE1 sin procesar, de "longitud completa" así como también cualquier forma de BACE1 que sea el resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de BACE1, *por ej.,* variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de BACE1 ejemplar se muestra en SEC ID NO: 49 a continuación, y es la secuencia para BACE1 humana, isoforma A según lo informado en Vassar *et al.*, *Science* 286:735–741 (1999), la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

MAQALPWLLLWMGAGVLPAHGTQHGIRLPLRSGLGGAPLGLRLPRETDEEPEEP
GRRGSFVEMVDNLRGKSGQGYYVEMTVGSPPQTLNILVDTGSSNFAVGAAPHP
FLHRYYQRQLSSTYRDLRKGVYVPYTQGKWEGELGTDLVSIPHGPNVTVRANIA
AITESDKFFINGSNWEGILGLAYAEIARPDDSLEPFFDSLVKQTHVPNLFSLQLCGA
GFPLNQSEVLASVGGSMIIGGIDHSLYTGSLWYTPIRREWYYEVIIVRVEINGQDLK
MDCKEYNYDKSIVDSGTTNLRLPKKVFEAAVKSIKAASSTEKFPDGFWLGEQLVC
WQAGTTPWNIFPVISLYLMGEVTNQSFRITILPQQYLRPVEDVATSQDDCYKFAIS
QSSTGTVMGAVIMEGFYVVFDRARKRIGFAVSACHVHDEFRTAAVEGPFVTLDM
EDCGYNIPQTDESTLMTIAYVMAAICALFMLPLCLMVCQWCCLRCLRQQHDDFA
DDISLLK (SEC ID NO: 49)

Diversas otras isoformas de BACE1 humana existen incluyendo isoformas B, C y D. Ver UniProtKB/Swiss–Prot Entrada P56817, la cual se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. La isoforma B es mostrada en SEC ID NO: 50 y difiere de la isoforma A (SEC ID NO: 49) en el sentido de que no tiene

los aminoácidos 190–214 (es decir, deleción de aminoácidos 190–214 de SEC ID NO: 49). La isoforma C es mostrada en SEC ID NO: 51 y difiere de la isoforma A (SEC ID NO: 49) en el sentido de que le faltan los aminoácidos 146–189 (*es decir,* deleción de los aminoácidos 146–189 de (SEC ID NO: 49). La isoforma D es mostrada en SEC ID NO: 52 y difiere de la isoforma A (SEC ID NO: 49) en el sentido de que le faltan los aminoácidos 146–189 y 190–214 (es decir, deleción de los aminoácidos 146–189 y 190–214 de SEC ID NO: 49).

En el presente contexto, "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se está tratando, y puede realizarse ya sea para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen, aunque sin limitarse a, prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la velocidad de progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o prognosis mejorada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son utilizados para retardar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar el progreso de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de anticuerpo que está involucrado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones de estructura conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables (HVRs). (Ver, *por ej.,* Kindt *et al. Kuby Immunology*, 6ta ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Por añadidura, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular pueden ser aislados utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para rastrear una genoteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, *por ej.,* Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880–887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624–628 (1991).

El término "vector," en el presente contexto, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está ligado. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autoreplicante así como también el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de

ácidos nucleicos a los cuales están ligados operativamente. Dichos vectores son denominados en la presente "vectores de expresión".

Los términos "trastorno neurológico" o "enfermedad neurológica" se refieren a, o describen, una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central y/o periférico en mamíferos. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, aunque sin limitarse a la siguiente lista de enfermedades y trastornos. Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anormalidades del sistema nervioso caracterizados por un señalización nerviosa inapropiada o descontrolada o falta de la misma, e incluyen, aunque sin limitarse a, dolor crónico (incluyendo dolor nociceptivo (dolor causado por una lesión a los tejidos corporales, incluyendo dolor relacionado con cáncer), dolor neuropático (dolor causado por anormalidades e los nervios, médula espinal o cerebro), y dolor sicogénico (total o mayormente relacionado con un trastorno sicológico), dolor de cabeza, migraña, neuropatía y síntomas o síndromes que acompañan a menudo a dichos trastornos neuropáticos tales como vértigo o náuseas. Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con depósitos proteináceos extracelulares en el SNC, incluyendo, aunque sin limitarse a, amiloidosis secundaria, amiloidosis relacionada con la edad, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Holandesa); el complejo Guam Parkinson–Demencia, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiforme transmisible, demencia relacionada con VIH, esclerosis lateral amiotrópica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (MCI), y enfermedades oculares relacionadas con la deposición de beta–amiloides (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas, y cataratas). Los cánceres del SNC son caracterizados por la proliferación aberrante de una o más células del SNC (es decir, una célula neural) e incluyen, aunque sin limitarse a, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, Schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma, y tumores extradurales, intramedulares o intradurales. Las enfermedades o trastornos oculares son enfermedades o trastornos del ojo, los cuales para los propósitos de esta invención se considera un órgano del SNC sujeto a BBB. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, aunque sin limitarse a, trastornos de la esclerótica, córnea, iris y cuerpo ciliar (es decir, escleritis, queratitis, úlcera córnea, abrasión

córnea, ceguera pasajera causada por el resplandor de la nieve, ceguera temporal causada por rayos ultravioleta, queratitis punctata superficial de Thygeson, neovascularización córnea, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis sicca, iritis y uveítis), trastornos de la lente (es decir, cataratas), trastornos de coroides y retina (es decir, desprendimiento de retina, retinosquisis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular (húmeda o seca), membrana epiretinal, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, moscas volantes, trastornos del nervio óptico y rutas visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusas de disco óptico), trastornos de músculo oculares/ acomodación del movimiento binocular/ refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesia, oftalmoplejía externa progresiva, esotropía, exotropía, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbiopía y oftalmoplejía), alteraciones visuales y ceguera (es decir, ambliopía, amarosis congénita de Lever, escotoma, ceguera de color, acromatopsia, nictalopía, ceguera, oncocercosis y micro–oftalmia/coloboma), enrojecimiento ocular, pupila de Argyll Robertson, queratomicosis, xeroftalmía y aniridia. Las infecciones virales o microbianas del SNC incluyen, aunque sin limitarse a, infecciones por virus (es decir, influenza, VIH, poliovirus, rubéola), bacterias (es decir, Neisseria sp., Streptococcus sp., Pseudomonas sp., Proteus sp., E. coli, S. aureus, Pneumococcus sp., Meningococcus sp., Haemophilus sp., y Mycobacterium tuberculosis) y otros microorganismos tales como hongos (es decir, levadura, Cryptococcus neoformans), parásitos (es decir, toxoplasma gondii) o amebas que dan como resultado fisiopatologías del SNC incluyendo, aunque sin limitarse a, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas. La inflamación del SNC es inflamación que es causada por una lesión al SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de médula espinal, conmoción cerebral) o una lesión debida a, o relacionada con, una o más otras enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección viral o microbiana). Isquemia del SNC, en el presente contexto, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con el flujo sanguíneo aberrante o comportamiento vascular en el cerebro o sus causas, e incluye, aunque sin limitarse a, isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, accidente cerebrovascular (es decir, hemorragia subaracnoide y hemorragia intracerebral), y aneurisma. Enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la pérdida de células neurales de función o muerte en el

SNC, y incluyen, aunque sin limitarse a, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, degeneración causada por, o asociada con una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum, y ataxia espinocerebelosa. Enfermedades y trastornos de ataques del SNC involucran la conducción eléctrica inapropiada y/o anormal en el SNC, e incluyen, aunque sin limitarse a, epilepsia (es decir, ataques con ausencias, ataques atónicos, epilepsia Rolandic benigna, ausencia de inicio en la niñez, ataques clónicos, ataques parciales complejos, epilepsia de lóbulo frontal, ataques febriles, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, síndrome de Lennox–Gastaut, síndrome de Landau–Kleffner, síndrome de Dravet, síndrome de Otahara, síndrome West, ataques mioclónicos, trastornos mitocondriales, epilepsias mioclónicas progresivas, ataques sicogénicos, epilepsia refleja, Síndrome de Rasmussen, ataques parciales simples, ataques secundariamente generalizados, epilepsia lobular temporal, ataques toniclónicos, ataques tónicos, ataques sicomotores, epilepsia límbica, ataques de inicio parcial, ataques de inicio generalizado, status epilepticus, epilepsia abdominal, ataques acinéticos, ataques autonómicos, mioclonus bilateral masivo, epilepsia catamenial, ataques atónicos, ataques emocionales, ataques focales, crisis gelásticas, marcha Jacksoniana, enfermedad de Lafora, crisis motoras, ataques multifocales, ataques nocturnos, ataque fotosensible, pseudo ataques, ataques sensoriales, crisis sutiles, ataques sylvan, convulsiones por abstinencia, y ataques reflejos visuales). Los trastornos del comportamiento son trastornos del SNC caracterizados por comportamiento aberrante por parte del sujeto que padece el trastorno e incluyen, aunque sin limitarse a, trastornos del sueño (es decir, insomnio, parasomnios, terrores nocturnos, trastornos del ritmo circadiano del sueño, y narcolepsia), trastornos anímicos (es decir, depresión, depresión suicida, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, ataques de pánico, trastorno obsesivo– compulsivo, trastorno de hiperactividad por déficit atencional (ADHD), trastorno de déficit atencional (ADD), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno de estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos alimenticios (es decir, anorexia o bulimia), sicosis, trastornos conductuales del desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Aspberger), trastornos de la personalidad y

trastornos sicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno de delirios y similares). Los trastornos de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos los cuales están en algunos casos asociados con el SNC o tienen síntomas específicos del SNC; dichos trastornos incluyen, aunque sin limitarse a la enfermedad de Tay–Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad e Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), enfermedad de almacenamiento de glicógeno, GM1–gangliosidosis, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan, y lipofuscinosis ceroidea neuronal tipos 1 y 2, enfermedad de Niemann–Pick, enfermedad de Pompe, y enfermedad de Krabbe.

II COMPOSICIONES Y MÉTODOS

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos los cuales se unen a BACE1 y reducen y/o inhiben la actividad de BACE1. En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen al sitio activo o a un exositio de BACE1.

A. Anticuerpos Anti–BACE1 Ejemplares

En un aspecto, la invención provee un anticuerpo anti–BACE1 que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas entre (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 o 120; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 o 121; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, 10, 18, 36–39, 41, 43, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 o 118; y (f) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11–16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 o 119.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias de VH HVR seleccionadas entre (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71–73 o 120; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24, 29, 46, 69, 74–78 o 121; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122.

En una realización, el anticuerpo comprende HVR–H1 que comprende l secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 22 o SEC ID NO: 23 o SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 71 o SEC ID NO: 72 o SEC ID NO: 73. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos

SEC ID NO: 24 o SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 74 o SEC ID NO: 75 o SEC ID NO: 76 o SEC ID NO: 77 o SEC ID NO: 78. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 25 o SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 79. En una realización, el anticuerpo comprende HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 28. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30.

En otra realización, el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 22; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 30. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 74; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 75; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 71; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 72; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 76; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEC ID NO: 25 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 77; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 79 o el anticuerpo comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 73; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78; y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende por lo menos una, por lo menos dos o las tres secuencias de VL HVR seleccionadas entre (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 8, 17, 35 y 42; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, 10, 18, 36–39, 41, 43, 56, 58–64 o 118; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11–16, 19, 40, 44, 57, 65–67 o 119.

En una realización, el anticuerpo comprende HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 9 o SEC ID NO: 10 o SEC ID NO: 58 o SEC ID NO: 59 o SEC ID NO: 60 o SEC ID NO: 61 o SEC ID NO: 62 o SEC ID NO: 63 o SEC ID NO: 64. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11 o SEC ID NO: 12 o SEC ID NO: 13 o SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 15 o SEC ID NO: 16 o SEC ID NO: 65 o SEC ID NO: 66 o SEC ID NO: 67. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 35. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 36–39. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 40.

En otra realización, el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID

NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 13 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 14 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 8; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 15. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 35; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 36; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 40 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 35; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 37; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 40 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 35; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 38; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 40 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 35; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 39; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 40.

En otra realización, el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 58; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 65 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 59; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12

o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 66 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 67 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 60; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 67 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 61; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 65 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 59; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 66 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 62; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 67 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 63; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12 o el anticuerpo comprende (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 64; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende (a) un dominio VH que comprende por lo menos una, por lo menos dos o las tres secuencias de VH HVR seleccionadas entre (i) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71–73 o 120 (ii) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 24, 29, 46, 69, 74–78 o 121 y (iii) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122; y (b) un dominio VL que comprende por lo menos una, por lo menos dos o las tres secuencias de VL HVR seleccionadas entre (i) HVR–L1 que comprende la

secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42, (ii) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 9, 10, 18, 36–39, 41, 43, 56, 58–64 o 118, y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 11–16, 19, 40, 44, 57, 65–67 o 119.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23; (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24; (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25; (d) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7; (e) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9; y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 12.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–H1, HVR–H2, HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GFX_{30}FX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}IH$ (SEC ID NO: 45), donde X_{30}=N o T; X_{31}=S, L o Y; X_{32}=G o Y; X_{33}=Y o S; y X_{34}=A, G o S; donde HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{35}X_{36}ISPX_{37}X_{38}GX_{39}TX_{40}YADSVKG$ (SEC ID NO: 46), donde X_{35}=A o G; X_{36}=W o S; X_{37}=A o Y; X_{38}=G o S; X_{39}=S o Y; y X_{40}=D o S; y donde HVR–H3 comprende la secuencia $X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ $X_{47}MDY$ (SEC ID NO: 47), donde X_{41}=Q o G; X_{42}=T o F; X_{43}=H o S; X_{44}=Y o P; X_{45}=Y o W; X_{46}=Y o V y donde X_{47} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEC ID NO: 120), donde X_{71}=F o Y; X_{72}=F, N o T; X_{73}=F o Y; X_{74}=L, Q, I, S o Y; X_{75}=G o Y; X_{76}=Y o S; y X_{77}=A, G o S; HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVKG$ (SEC ID NO: 121), donde X_{78}=A o G; X_{79}=W o S; X_{80}=A, S, Q o Y; X_{81}=G o S; X_{82}=S, K, L o Y; X_{83}=T o Y; y X_{84}=D o S; y HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEC ID NO: 122), donde X_{85}=Q o G; X_{86}=T o F; X_{87}=H, Y o S; X_{88}=Y o P; X_{89}=Y o W; X_{90}=Y o V y donde X_{91} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–L1, HVR–L2, HVR–L3, donde HVR–L1

comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$, (SEC ID NO: 42) donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, donde HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{22}ASX_{23}LYS$ (SEC ID NO: 43), donde X_{22}=S, W, Y o L; X_{23}=F, S o W, y donde HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}T$ (SEC ID NO: 44), donde X_{24}=S, F, G, D o Y; X_{25}=Y, P, S o A; X_{26}=Y, T o N; X_{27}=T, Y, D o S; X_{28}=P o L; y X_{29}=F, P o T.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEC ID NO: 42), donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, donde HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{62}ASX_{63}X_{64}YX_{65}$ (SEC ID NO: 118), donde X_{62}=S, W, Y, F o L; X_{63}=F, S, Y o W; X_{64}=L o R; X_{65}=S, P, R, K o W, y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}T$ (SEC ID NO: 119), donde X_{66}=S, F, G, D o Y; X_{67}=Y, P, S o A; X_{68}=Y, T o N; X_{69}=T, Y, D o S; X_{70}=P, Q, S, K o L; y X_{71}=F, P o T.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–L1, HVR–L2, HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A; X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L, donde HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_6ASFLYS$ (SEC ID NO: 18), donde X_6=S o L, y donde the HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}T$ (SEC ID NO: 19), donde X_7=S, F, G, D o Y; X_8=Y, P, S, o A; X_9=T o N; X_{10}=T, Y, D o S; X_{11}=P o L; X_{12}=P o T.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–L1, HVR–L2, HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A; X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L, donde HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{48}ASX_{49}X_{50}YX_{51}$ (SEC ID NO: 56), donde X_{48}=S o F; X_{49}=F o Y; X_{50}=L o R; X_{51}=S, P, R, K o W, donde HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQFPTYX_{52}PT$ (SEC ID NO: 57) , donde X_{52}=L, Q, S o K.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–H1, HVR–H2, HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GFTFX_{13}GYX_{14}IH$ (SEC ID NO: 26), donde X_{13}=S o L y X_{14}=A o G, donde HVR–H2 comprende la secuencia de

aminoácidos GWISPAGGSTDYADSVKG (SEC ID NO: 24), y donde la HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos GPFSPWVMDY (SEC ID NO: 25).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–H1, HVR–H2, HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (SEC ID NO: 68), donde X_{53}=F o Y; X_{54}=T o F; X_{55}=F o Y; X_{56}=L, Q o I, donde HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $GWISPX_{57}X_{58}GX_{59}X_{60}DYADSVKG$ (SEC ID NO: 69), donde X_{57}=A, S o Q; X_{58}=G o S; X_{59}=S, K o L; X_{60}=T o Y, y donde la HVR–H3 sequence comprende la secuencia de aminoácidos $GPFX_{61}PWVMDY$ (SEC ID NO: 70) , donde X_{61}=S o Y.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende por lo menos una secuencia seleccionada entre HVR–L1, HVR–L2, HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSAVA (SEC ID NO: 35), donde HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{15}ASX_{16}LYS$ (SEC ID NO: 41), donde X_{15}=S, W o Y y X_{16}=S o W, y donde HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYSYSPFT (SEC ID NO: 40).

En ciertas realizaciones, cualquiera o más aminoácidos de un anticuerpo anti–BACE1, según lo proporcionado, anteriormente se sustituyen en las siguientes posiciones de HVR:

en HVR–H1 (SEC ID NO: 26): posiciones 5 y 8;

en HVR–L1 (SEC ID NO: 17): posiciones 5, 7, 8, 9 y 10;

en HVR–L2 (SEC ID NO: 18): posición 1 o HVR–L2 (SEC ID NO: 41) posiciones 1 y 4; y

en HVR–L3 (SEC ID NO: 19): posiciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En ciertas realizaciones, las sustituciones son sustituciones conservadoras, según lo proporcionado en la presente invención. En ciertas realizaciones, cualquiera o más de las siguientes sustituciones puede realizarse en cualquier combinación:

en HVR–H1 (SEC ID NO: 26): serina o leucina en posición 5 y alanina o glicina en posición 8;

en HVR–L1 (SEC ID NO: 17): ácido aspártico o valina en posición 5; serina o alanina en posición 7; treonina o asparagina en posición 8; serina o alanina en posición 9 y valina o leucina en posición 10;

en HVR–L2 (SEC ID NO: 18): serina o leucina en posición 1 o HVR–L2 (SEC ID NO: 41) serina, tirosina o triptofano en posición 1 o tirosina, serina o triptofano en posición 4; y

en HVR–L3 (SEC ID NO: 19): serina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico o tirosina en posición 3; tirosina o prolina en posición 4, serina, alanina, treonina o asparagina en posición 5; tirosina, treonina, ácido aspártico o serina en posición 6, ácido aspártico, serina, prolina o leucina en posición 7 y prolina o treonina en posición 8.

En ciertas realizaciones, las sustituciones son sustituciones conservadoras, según lo proporcionado en esta invención. En ciertas realizaciones, puede realizarse cualquiera o más de las siguientes sustituciones en cualquier combinación:

en HVR–H1 (SEC ID NO: 26): S5L y A8G;

en HVR–L1 (SEC ID NO: 17): D5V; S7A; T8N; S9A y V10L;

en HVR–L2 (SEC ID NO: 18): S1L o HVR–L2 (SEC ID NO: 41) posiciones S1W o Y y S4W; y

en HVR–L3 (SEC ID NO: 19): posiciones S3F, G, D o YI; Y4P, S o A; T5N; T6Y, D o S; P7L y P8T.

En ciertas realizaciones, cualquiera o más aminoácidos de un anticuerpo anti–BACE1, según lo proporcionado, anteriormente son sustituidos en las siguientes posiciones de HVR:

en HVR–H1 (SEC ID NO: 120): posiciones 2, 3, 5, 6, 7 y 8;

en HVR–H2 (SEC ID NO: 121): posiciones 1, 2, 6, 7, 9, 10, y 11;

en HVR–H3 (SEC ID NO: 122) posiciones 1, 3, 4, 5, 6, 7, y 8

en HVR–L1 (SEC ID NO: 42): posiciones 5, 7, 8, 9 y 10;

en HVR–L2 (SEC ID NO: 118): posición 1, 4, 5 y 7; y

en HVR–L3 (SEC ID NO: 119): posiciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

En ciertas realizaciones, las sustituciones son sustituciones conservadoras, según lo proporcionado en esta invención.

Las combinaciones posibles de las sustituciones antes mencionadas son abarcadas por las secuencias de consenso de SEC ID NO: 42–47 y 118–122 según lo descrito con anterioridad.

En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas, un anticuerpo anti–BACE1 es humanizado. En una realización, un anticuerpo anti–BACE1 comprende HVRs como en cualquiera de las realizaciones antes mencionadas y comprende además una estructura humana aceptora, por ej., una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humana. En otra realización, un anticuerpo anti–BACE1 comprende HVRs como en cualquiera de las realizaciones antes mencionadas y comprende además una VH o VL que

comprende una secuencia FR1, FR2, FR3, o FR4 de SEC ID NO: 1–6, 20, 21, 27, 31–34, 80–98 y 99–117.

En otro aspecto, un anticuerpo anti–BACE1 comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 20, 21, 27 y 80–98. En ciertas realizaciones, una secuencia VH que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ej.,* sustituciones conservadoras), inserciones, o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pro un anticuerpo anti–BACE1 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a BACE1 y/o de inhibir o reducir la actividad de BACE1. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o delecionados en SEC ID NO: 20, 21, 27 y 80–98. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti–BACE1 comprende la secuencia de VH en SEC ID NO: 20, 21, 27 o 80–98, incluyendo las modificaciones post–traducción de esa secuencia. En una realización en particular, la VH comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas entre: (a) HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 22, 23, 26, 28, 45, 68, 71, 72, 73 o 120, (b) HVR–H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24, 29, 46, 69, 74, 75, 76, 77, 78 o 121, y (c) HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 25, 30, 47, 70, 79 o 122.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti–BACE1 que comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVRs seleccionadas entre la (a) HVR–H1 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(B), 2(B) y 24(A); (b) HVR–H2 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(B), 2(B) y 24(B); (c) HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(B), 2(B) y 24(C); (d) HVR–L1 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(A), 2(A) y 23(A); (e) HVR–L2 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(A), 2(A) y 23(B); y (f) HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos en las Figuras 1(A) y 2(A) y 23(C).

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena liviana (VL) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de

identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 1–6, 31–34 y 99–117. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad contiene sustituciones (*por ej.,* sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti–BACE1 que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse a BACE1 y/o de inhibir o reducir la actividad de BACE1. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o delecionados en SEC ID NO: 1–6, 31–34 y 99–117. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones, o deleciones se producen en regiones fuera de las HVRs (es decir, en las FRs). Opcionalmente, el anticuerpo anti–BACE1 comprende la secuencia de VL en SEC ID NO: 1–6, 31–34 o 99–117, incluyendo las modificaciones pos–traducción de esa secuencia. En una realización en particular, la VL comprende una, dos o tres HVRs seleccionadas entre (a) HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, 8, 17, 35 o 42; (b) HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9, 10, 18, 36–39, 41, 43 y 56, 58–64 o 118; y (c) HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 11–16, 19, 40, 44, 57, 65, 66, 67 o 119.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1, donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID NO: 21 y SEC ID NO: 2, respectivamente, incluyendo las modificaciones post–traducción de aquellas secuencias.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti–BACE1 proporcionado en la presente invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti–BACE1 que comprende una secuencia de VH seleccionada entre SEC ID NO: 20, 21, 27 y 80–98 y una secuencia de VL seleccionada entre SEC ID NO: 1–6, 31–34 y 99–117. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que un anticuerpo anti–BACE1 que comprende las secuencias de VH y VL en SEC ID NO: 21 y SEC ID NO: 2, respectivamente.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítopo dentro de BACE1 que comprende por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por

lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve aminoácido(s) los cuales corresponden a los aminoácidos 314 SER, 316 GLU, 317 LYS, 318 PHE, 319 PRO, 327 GLN, 328 LEU, 329 VAL, 330 CYS, 331 TRP, 332 GLN, 333 ALA, 335 THR, 337 PRO, 340 ILE, 375 THR, 378 ASP, 380 CYS, 426 PHE de SEC ID NO: 49.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítopo dentro de BACE1 que comprende por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve aminoácido(s) los cuales corresponden a los aminoácidos 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49. En otras realizaciones el epítopo conformacional comprende aminoácidos los cuales corresponden a 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49. Se apreciará que los aminoácidos identificados en el epítopo de BACE1 corresponden a la secuencia de la isoforma A de BACE1 humana. Sin embargo, el epítopo conformacional de BACE1 descrito también abarca los aminoácidos correspondientes en otras variantes e isoformas de BACE1 y el epítopo puede incluir a los aminoácidos que no son los residuos especificados.

En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítopo dentro de BACE1 que comprende por lo menos una, por lo menos dos o por lo menos tres region(es) de aminoácidos de BACE1 que corresponden a los aminoácidos 315–318 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 331–335 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 370–381 de SEC ID NO: 49; o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el anticuerpo se une a un epítopo de BACE1 que comprende los aminoácidos 315–318, 331–335 y 370–381 de SEC ID NO: 49.

En otra realización se proporciona un anticuerpo que se une a un epítopo dentro de BACE1 lo cual da como resultado un cambio conformacional en los sitios P6 y/o P7 (Turner *et al.*, *Biochemistry* 44:105–112 (2005)) de BACE1 luego de la unión relativa a BACE1 sin el anticuerpo unido. En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítopo de BACE1 lo cual induce a que los aminoácidos 218–231 de SEC ID NO: 49 de BACE1 adopten una estructura de lazo aleatoria. Aminoácidos 218–231 de SEC ID NO: 49 de BACE1 existen en una estructura de hélice α en el complejo unido al sustrato.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un sitio dentro de BACE1 según lo indicado en las Figuras 14 y 15 y según lo descrito en la estructura cristalina de BACE1 y el anticuerpo anti–BACE1, YW412.8.31 (Ejemplo 3(B)).

En otras realizaciones, se proporciona un anticuerpo que se une a un exositio dentro de BACE1. En una realización, el exositio dentro de BACE1 es el mismo exositio que aquel identificado por Kornacker *et al.*, *Biochem.* 44:11567–11573 (2005). En una realización, se proporciona un anticuerpo que compite con los péptidos identificados en Kornacker *et al.*, *Biochem.* 44:11567–11573 (2005), dicho documento se incorpora a la presente como referencia en su totalidad, (es decir, Péptidos 1, 2, 3, 1–11, 1–10, 1–9, 1–8, 1–7, 1–6, 2–12, 3–12, 4–12, 5–12, 6–12, 7–12, 8–12, 9–12, 10–12, 4, 5, 6, 5–10, 5–9, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A y L11A) para la unión a BACE1.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo que compite por la unión (*por ej.,* se une al mismo epítopo) como cualquier anticuerpo anti–BACE1 descrito en esta invención.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti–BACE1 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti–BACE1 es un fragmento de anticuerpo, *por ej.,* un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o fragmento $F(ab')_2$. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, *por ej.,* un anticuerpo IgG1 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo según lo definido en esta invención.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti–BACE1 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, según lo descrito en las Secciones 1–7 a continuación:

1. Afinidad de Anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, o ≤ 0.001 nM (*por ej.* 10^{-8} M o menos, *por ej.* entre 10^{-8} M y 10^{-13} M, *por ej.,* entre 10^{-9} M y 10^{-13} M).

En una realización, Kd se mide por un ensayo de unión al antígeno radioetiquetado (RIA, por sus siglas en inglés) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno según lo descrito por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fabs para el antígeno se mide equilibrando Fab

con una concentración mínima de antígeno (^{125}I)–etiquetado en presencia de una serie de titulación de antígeno no etiquetado, luego capturando antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti–Fab (ver, *por ej.,* Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865–881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante toda la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti–Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9.6), y posteriormente bloqueado con 2% (p/v) de seroalbúmina bovina en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezcla 100 pM o 26 pM de [^{125}I]–antígeno con diluciones seriadas de un Fab de interés (*por ej.,* consistente con la evaluación del anticuerpo anti–VEGF, Fab–12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593–4599 (1997)). El Fab de interés es luego incubado durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (*por ej.,* aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (*por ej.,* durante una hora). Luego, la solución se elimina y la placa se lava ocho veces con 0,1% polisorbato 20 (TWEEN–20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT–20 ™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT ™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a 20% de unión máxima se seleccionan para utilizar en ensayos de unión competitivos.

De acuerdo con otra realización, Kd se mide empleando ensayos de resonancia de plasmón superficial empleando un BIACORE®–2000 o un BIACORE ®–3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés). Brevemente, se activa chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) con *N*–etil–*N'*– (3–dimetilaminopropil)–carbodiimida clorhidrato (EDC) y *N*–hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos sin reaccionar. Para las mediciones de la cinética, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0.05% del surfactante polisorbato 20 (TWEEN–20™) (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente

25 µl/min. Se calculan los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) empleando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (BIACORE ® Evaluation Software versión 3.2) mediante ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Ver, *por ej.,* Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si el índice on (encendido) excede 10^6 M^{-1} s^{-1} por el ensayo de resonancia de plasmón superficial antes mencionado, entonces el índice on (encendido) puede ser determinado empleando una técnica de templado fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de las emisiones de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de un anticuerpo anti–antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con paro de flujo ("stop–flow") (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM–AMINCO ™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en esta invención es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque sin limitarse a, fragmentos Fab, Fab', Fab'–SH, $F(ab')_2$, Fv, y scFv, y otros fragmentos descritos más adelante. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, ver Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129–134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, ver, *por ej.,* Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., (Springer–Verlag, Nueva York), pp. 269–315 (1994); ver además WO 93/16185; y Patentes Estadounidenses Nos. 5.571.894 y 5.587.458. Para una descripción de fragmentos Fab y $F(ab')_2$ que comprenden residuos de epítopo de unión al receptor de rescate y con vida útil in vivo aumentada, ver la Patente Estadounidense No. 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129–134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444–6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos son también descritos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena liviana de un anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, *por ej.,* Patente Estadounidense No. 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo pueden ser preparados por diversas técnicas, incluyendo aunque sin limitarse a digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como también producción mediante células huésped recombinantes (*por ej. E. coli* o fago), según lo descrito en esta invención.

3. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente invención es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos son descritos, *por ej.,* en la Patente Estadounidense No. 4.816.567; y Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (*por ej.,* una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "de cambio de clase" en el cual la clase o subclase ha sido cambiada de aquella del anticuerpo progenitor. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión al antígeno.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir la inmunogenicidad a seres humanos, reteniendo al mismo tiempo la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano progenitor. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los cuales HVRs, *por ej.,* CDRs, (o sus porciones) son derivadas de un anticuerpo no humano y FRs (o sus porciones) son derivadas de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado son sustituidos con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (*por ej.,* el anticuerpo del cual derivan los residuos de HVR), *por ej.,* para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y métodos para su preparación son revisados, *por ej.,* en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008), y son adicionalmente descritos, *por ej.,* en Riechmann *et al., Nature* 332:323–329 (1988); Queen *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029–10033 (1989); Patentes Estadounidenses Nos. 5. 821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Kashmiri *et al., Methods* 36:25–34 (2005) (que describe injerto de SDR (a–CDR)); Padlan,

Mol. Immunol. 28:489–498 (1991) (que describe "resurfacing" ("resuperficialización"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43–60 (2005) (que describe "FR shuffling" ("barajado de FR2)); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61–68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252–260 (2000) (que describe el método de "selección guiada" al barajado de FR).

Las regiones de estructura humanas que pueden emplearse para la humanización incluyen aunque sin limitarse a: regiones de estructura seleccionadas empleando el método "best–fit" (ver, *por ej.,* Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones de estructura derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de regiones variables de cadena liviana o pesada (ver, *por ej.,* Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al. J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones de estructura maduras (somáticamente mutadas) humanas o regiones de estructura de línea germinal humanas (ver, *por ej.,* Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)); y regiones de estructura derivadas del screening de genotecas de FR (*véase, por ej.,* Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678–10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611–22618 (1996)).

4. Anticuerpos Humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos empleando diversas técnicas conocidas en el arte. Los anticuerpos humanos son descritos en términos generales en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden ser preparados mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas como respuesta al desafío antigénico. Ese tipo de animales típicamente contiene la totalidad o una porción de los sitios de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan a los sitios de inmunoglobulina endógenos, o los cuales están presentes extracromosómicamente o integrados al azar en los cromosomas del animal. En ese tipo de ratones transgénicos, los sitios de inmunoglobulina endógenos han sido generalmente inactivados. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117–1125 (2005). Ver además, *por ej.,* Patentes Estadounidenses Nos. 6.075.181 y 6.150.584 que describen la

tecnología XENOMOUSE™; Patente Estadounidense No. 5.770.429 que describe la tecnología HuMAb®; Patente Estadounidense No. 7.041.870 que describe la tecnología K–M MOUSE®, y Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados mediante dichos animales pueden ser adicionalmente modificadas, *por ej.,* combinando con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden ser preparados mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón– humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ej., Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques y Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de células B humano son descritos también en Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557–3562 (2006). Métodos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humana monoclonales de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265–268 (2006) (que describe hibridomas humanos– humanos). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) es también descrita en Vollmers y Brandlein, *Histology y Histopathology*, 20(3):927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods y Findings in Experimental y Clinical Pharmacology*, 27(3):185–91 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden ser generados aislando secuencias de dominios variables del clon Fv seleccionadas de genotecas de exhibición de fagos derivadas de humanos. Dichas secuencias de dominio variable pueden luego combinarse con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen técnicas para la selección de anticuerpos humanos de genotecas de anticuerpos.

5. Anticuerpos Derivados de Genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden ser aislados mediante el screening de genotecas combinatoriales para anticuerpos con la actividad deseada o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce en la técnica una variedad de métodos para generar genotecas de exhibición de fagos y screening de dichas genotecas para anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos son revisados, *por ej.,* en Hoogenboom *et al.* en *Methods in*

Molecular Biology 178:1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y adicionalmente descritos, *por ej.,* en the McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552–554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581–597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161–175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467–12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132(2004).

En ciertos métodos de exhibición de fagos, repertorios de genes VH y VL son clonados por separado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y son recombinados al azar en genotecas de fagos, que luego pueden ser seleccionados para fagos de unión al antígeno según lo descrito en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433–455 (1994). El fago típicamente exhibe fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv (scFv) de cadena única o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad contra el inmunógeno sin el requerimiento de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio "naive" (no tratado) puede ser clonado (*por ej.,* de humano) para proporcionar una sola fuente de anticuerpos contra un amplio rango de no autoantígenos y también autoantígenos sin inmunización alguna según lo descrito por Griffiths *et al.*, *EMBO J,* 12: 725–734 (1993). Finalmente, las genotecas naive también pueden ser preparadas sintéticamente clonando segmentos de gen en V no reordenados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencia al azar para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr reordenamiento *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381–388 (1992). Las publicaciones de patentes que describen genotecas con fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: Patente Estadounidense No. 5.750.373, y Publicaciones de Patentes Estadounidenses Nos. 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de genotecas de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en esta invención.

6. Anticuerpos Multiespecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente invención es un anticuerpo multiespecífico, *por ej.* un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen

especificidades de unión para por lo menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para BACE1 y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de BACE1. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser empleados para localizar agentes citotóxicos a células que expresan BACE1. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, aunque sin limitarse a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada–cadena liviana de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), y ingeniería "knob–in–hole" ("perilla en el agujero") (véase, por ej., Patente Estadounidense No. 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también pueden ser preparados mediante efectos de dirección electrostática por ingeniería genética para preparar moléculas Fc–heterodiméricas de anticuerpos (WO 2009/089004A1); entrecruzamiento de dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ej., Patente Estadounidense No. 4.676.980, y Brennan *et al., Science*, 229: 81 (1985)); uso de cierres de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ej., Kostelny *et al., J. Immunol.*, 148(5):1547–1553 (1992)); uso de tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ej., Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444–6448 (1993)); y uso de dímeros de Fc de una sola cadena (sFv) (ver, *por ej.* Gruber *et al., J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparación de anticuerpos triespecíficos según lo descrito, *por ej.,* en Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos construidos por técnicas de ingeniería genética con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos Pulpo" son también incluidos en esta invención (ver, *por ej.* US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento del mismo también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a BACE1 así como también otro, antígeno diferente (*ver,* US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en esta invención. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo

pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución puede realizarse para arribar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, *por ej.,* unión al antígeno.

a) Variantes de Sustitución, Inserción y Deleción

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las HVRs y FRs. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones conservadoras". Más cambios sustanciales son proporcionados en la Tabla 1 bajo el encabezamiento "sustituciones ejemplares" y según lo descrito adicionalmente más adelante con referencia a clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser introducidas en un anticuerpo de interés y los productos seleccionados para una actividad deseada, *por ej.,* unión al antígeno retenida/ mejorada, disminución de inmunogenicidad, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

Residuo Original	**Sustituciones Ejemplares**	**Sustituciones Preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticis: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras abarcarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional involucra sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo progenitor (*por ej.* un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudio adicional tendrán modificaciones (*por ej.,* mejoras) en ciertas propiedades biológicas (*por ej.,* mayor afinidad, menor inmunogenicidad) con relación al anticuerpo progenitor y/o tendrán ciertas propiedades biológicas sustancialmente retenidas del anticuerpo progenitor. Una variante sustitucional ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, el cual puede ser generado convenientemente, *por ej.,* utilizando técnicas de maduración por afinidad basadas en exhibición de fagos tales como aquellas descritas en la presente invención. Resumidamente, uno o más residuos de HVR son mutados y los anticerpos variantes exhibidos

sobre fago y seleccionados para una actividad biológica en particular (*por ej.* afinidad de unión).

Pueden realizarse alteraciones (*por ej.,* sustituciones) en HVRs, *por ej.,* para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden realizarse en "puntos calientes" de HVR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutación a elevada frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ej., Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008)), y/o SDRs (a–CDRs), analizándose VH o VL variante resultante par afinidad de unión. La maduración por afinidad construyendo y reseleccionando de genotecas secundarias ha sido descrita, *por ej.,* en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1–37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) En algunas realizaciones de maduración por afinidad, se introduce diversidad en los genes variables seleccionados para maduración por cualquiera de una variedad de métodos (*por ej.,* PCR con tendencia al error, barajado de cadenas, o mutagénesis dirigida a oligonucleótidos). Luego se crea una genoteca secundaria. A continuación, la genoteca es seleccionada para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad involucra métodos dirigidos a HVR., en los cuales diversos residuos de HVR (*por ej.,* 4–6 residuos a la vez) son distribuidos al azar. Los residuos de HVR involucrados en la unión al antígeno pueden ser específicamente identificados, *por ej.,* utilizando mutagénesis o modelado por exploración de alanina. CDR–H3 y CDR–L3 en particular son a menudo tomados como objetivos.

En ciertas realizaciones, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVRs siempre y cuando dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse en HVRs alteraciones conservadoras (*por ej.,* sustituciones conservadoras según lo proporcionado en esta invención) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden ser fuera de los "puntos calientes" de la HVR o SDRs. En ciertas realizaciones de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR es inalterada, o no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puede ser buscado para mutagénesis se denomina "mutagénesis con barrido de alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science,* 244:1081–1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivo (*por ej.,* residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) son identificados y

reemplazados por un aminoácido neutro o cargado negativamente (*por ej.,* alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno es afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en los sitios de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno– anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos lindantes pueden ser buscados como objetivo o eliminados como candidatos para sustitución. Las variantes pueden ser seleccionadas para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino– y/o carboxilo que oscilan en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como también inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo de terminal N. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al término N o C del anticuerpo a una enzima (*por ej.* para ADEPT) o un polipéptido el cual aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

b) <u>Variantes de glicosilación</u>

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente invención es alterado para aumentar o reducir el grado hasta el cual el anticuerpo es glicosilado. La adición o deleción de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crea o elimina uno o más sitios de glicosilación.

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos mediante células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenario que está generalmente unido mediante una ligación N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ej., Wright *et al. TIBTECH* 15:26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, *por ej.,* manosa, N–acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como también fucosa unida a una GlcNAc en el "tronco" de la estructura del oligosacárido biantenaria. En algunas realizaciones, las modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención pueden realizarse a fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o

indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser entre 1% y 80%, entre 1% y 65%, entre 5% y 65% o entre 20% y 40%. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ej., estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) según lo medido por espectrometría de masas MALDI–TOF, según lo descrito en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de residuos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación puede tener función de ADCC mejorada. Véase, por ej., Publicaciones de Patentes Estadounidenses Nos. US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yamane–Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación proteica (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); Sol. Pat EEUU No US 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11), y líneas celulares "knockout", tales como gen de alfa–1,6–fucosiltransferasa, *FUT8,* células CHO "knockout" (véase, por ej., Yamane–Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006); y WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisecados, *por ej.,* en las cuales un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo es bisecado mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, *por ej.,* en WO 2003/011878 (Jean–Mairet *et al.*); Patente Estadounidense No. 6.602.684 (Umana

et al.); y US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Las variantes de anticuerpos con por lo menos un residuo galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc también son proporcionadas. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos son descritas, *por ej.,* en WO 1997/30087 (Patel *et al.*); WO 1998/58964 (Raju, S.); y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente invención, generando de ese modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (*por ej.,* una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*por ej.* una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que la hacen un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* es importante aunque ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesaria o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/ depleción de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden efectuar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carezca de unión al FcγR (por ende careciendo probablemente de actividad de ADCC), pero que retenga la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc(RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457–492 (1991). Los ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente Estadounidense No. 5.500.362 (ver, *por ej.* Hellstrom, I. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5.821.337 (ver Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). Alternativamente, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre

periférica (PBMC) y células Natural Killer (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, *por ej.*, en un modelo animal tal como aquel descrito en Clynes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652–656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo sea incapaz de unirse a C1q y por ende carezca de actividad de CDC. Véase, por ej., C1q y C3c binding ELISA en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano–Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045–1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). Las determinaciones de la unión al FcRn y evacuación/vida media *in vivo* también pueden realizarse empleando métodos conocidos en la técnica (véase, por ej., Petkova, S.B. *et al.*, *Intl. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente Estadounidense No. 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con sustitución de residuos 265 y 297 a alanina (Patente EEUU No. 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcRs. (Véase, por ej., Patente Estadounidense No. 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001).)

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos las cuales mejoran ADCC, *por ej.*, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que dan como resultado unión a C1q y/o Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o reducida), *por ej.*, según lo descrito en la Patente Estadounidense No. 6.194.551, WO 99/51642, y Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con vidas medias aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), según lo descrito en US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Aquellos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma

que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, *por ej.,* sustitución de residuo de región Fc 434 (Patente Estadounidense No. 7.371.826).

Ver además Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988); Patente Estadounidense No. 5.648.260; Patente Estadounidense No. 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc.

d) Variantes de anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética con cisteína, *por ej.,* "tioMAbs," en donde uno o más residuos de un anticuerpo son sustituidos con residuos cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo aquellos residuos con cisteína, grupos tiol reactivos son así posicionados en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de fármaco– ligante, para crear un inmunoconjugado, según lo descrito adicionalmente en esta invención. En ciertas realizaciones, cualquiera o más de los siguientes residuos puede ser sustituido con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética con cisteína pueden ser generados según lo descrito, *por ej.,* en la Patente Estadounidense No. 7.521.541.

e) Derivados de Anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente invención puede ser adicionalmente modificado para contener restos no proteináceos adicionales que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivación del anticuerpo incluyen, aunque sin limitarse a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles incluyen, aunque sin limitarse a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli–1, 3–dioxolano, poli–1,3,6–trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros al azar), y dextrano o poli(n–vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de

propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/ óxido de etileno, polioles polioxietilados (*por ej.,* glicerol), polivinil alcohol, y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la manufactura debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o tipo de polímeros empleados para la derivación pueden determinarse en base a consideraciones que incluyen, aunque sin limitarse a, las propiedades o funciones en particular del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado de anticuerpo será empleado en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, los conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente mediante exposición a radiación so proporcionados. En una realización, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600–11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluyen, aunque sin limitarse a, longitudes de ondas que no dañan a las células comunes, sino que calientan el resto no proteináceo hasta una temperatura a la cual las células próximas al resto no proteináceo del anticuerpo son matadas.

B. Métodos Recombinantes y Composiciones

Los anticuerpos pueden ser producidos empleando métodos recombinantes y composiciones, *por ej.,* según lo descrito en la Patente Estadounidense No. 4.816.567. En una realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti–BACE1 descrito en esta invención. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (*por ej.,* las cadenas liviana y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (*por ej.,* vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En una realización de ese tipo, una célula huésped comprende (*por ej.,* ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de

aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una realización, la célula huésped es eucariótica, *por ej.* una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés) o célula linfoide (*por ej.,* célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti–BACE1, donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, según lo proporcionado anteriormente, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti–BACE1, ácido nucleico que codifica un anticuerpo, *por ej.,* según lo descrito anteriormente, es aislado e insertado en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado empleando procedimientos convencionales (*por ej.,* utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican un anticuerpo incluyen células procarióticas o eucarióticas descritas en la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser producidos en bacterias, en particular cuando la glicosilación y la función efectora de Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ej., Patentes Estadounidenses Nos. 5.648.237, 5.789.199, y 5.840.523. (Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245–254, las cuales describen la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo puede ser aislado de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede ser adicionalmente purificado.

Además de procariotas, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo hongos y cepas de levadura cuyas rutas de glicosilación han sido "humanizadas", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409–1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210–215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado son también derivadas de organismos multicelulares (invertebrados y

vertebrados). Ejemplos de células de invertebrado incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden emplearse en conjunto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también pueden utilizarse como huéspedes. *Véase, por ej.,* Patentes Estadounidenses Nos. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978, y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también pueden utilizarse como huéspedes. Por ejemplo, líneas de células de mamífero que son adaptadas para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS–7); línea de riñón embriónico humano (293 o células 293 según lo descrito, *por ej.,* en Graham *et al., J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebe (BHK); células sertoli de ratón (células TM4 según lo descrito, *por ej.,* en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO–76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células renales caninas (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células pulmonares humanas (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, según lo descrito, *por ej.,* en Mather *et al., Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares de huéspedes mamíferos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células $DHFR^-$ CHO (Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células huéspedes de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ej., Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255–268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención pueden ser identificados, seleccionados, o caracterizados para determinar sus propiedades físicas/ químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención es analizado para determinar su actividad de unión al antígeno, *por ej.,* mediante métodos conocidos tales como ELISA, Western blot, etc.

En otro aspecto, pueden utilizarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos o Fabs descritos en la presente invención, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10 para la unión a BACE1. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competitivo se une al mismo epítopo (*por ej.,* un epítopo lineal o conformacional) que está unido mediante cualquiera de los anticuerpos o Fabs descritos en esta invención, por ejemplo, YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10. Los métodos ejemplares detallados para mapear un epítopo al cual se une un anticuerpo son proporcionados en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, se incuba BACE1 inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une a BACE1 (*por ej.,* YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29, YW412.8.51, Fab12, LC6, LC9, LC10) y un segundo anticuerpo no etiquetado que está siendo ensayado para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión a BACE1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como un control, se incuba BACE1 inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo etiquetado pero no el segundo anticuerpo no etiquetado. Después de la incubación bajo condiciones permisivas para la unión del primer anticuerpo a BACE1, se elimina anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de etiqueta asociada con BACE 1 inmovilizada. Si la cantidad de etiqueta asociada con BACE1 inmovilizada es sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con relación a la muestra control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo para la unión a BACE1. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti–BACE1 que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, *por ej.,*

inhibición o reducción de la actividad de aspartil proteasa de BACE1; o la inhibición o reducción en la disociación de APP por BACE1; o inhibición o reducción en la producción de Aβ. También se proveen anticuerpos que tienen dicha actividad biológica in vivo y/o in vitro.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la invención es analizado para determinar dicha actividad biológica. Por ejemplo, la actividad de proteasa de BACE1 puede ser analizada en un ensayo de HTRF fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea o un ensayo electroforético capilar de microfluidos (MCE), según lo descrito en detalle en el Ejemplo 1 y 2(B), utilizando péptidos de sustrato sintéticos.

Brevemente, puede emplearse un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF) para medir la actividad de aspartil proteasa de BACE1 con el uso de un péptido de sitio de disociación de BACE1 proteína precursora del amiloide. Por ejemplo, el péptido Bi27 (Biotina–KTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKL (SEC ID NO: 53), American Peptide Company)), se combina con BACE1 pre–incubada con un anticuerpo anti–BACE en buffer de reacción de BACE (acetato sódico 50 mM pH 4.4 y 0.1% CHAPS) en una placa de 384 pocillos (Proxiplate™, Perkin–Elmer). La mezcla de reacción proteolítica se incuba a temperatura ambiente durante 75 minutos y se templó mediante la adición de 5 µL de mezcla de detección por HTRF que contenía 2 nM de Estreptavidina–D2 y 150 nM de un anticuerpo anti–amiloide beta etiquetado con criptato de Europio en buffer de detección (Tris 200 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, 0,1% BSA, y 0,8M KF). La mezcla de reacción final se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos y se mide la señal TR–FRET utilizado un lector de placas de múltiples etiquetas EnVision Multilabel Plate Reader™ (Perkin–Elmer) a una longitud de onda de excitación de 320 nm y longitudes de ondas de emisión de 615 y 665 nm.

Puede llevarse a cabo una reacción de ensayo MCE en una reacción enzimática convencional, iniciada por la adición de sustrato a enzima y 4x compuesto, que contenía BACE1 humana (dominio extracelular), péptido de sitio activo de secretasa de proteína precursora del amiloide beta (FAM–KTEEISEVNLDAEFRWKK–$CONH_2$ (SEC ID NO: 55)), NaOAc 50 mM pH 4.4 y 0.1% CHAPS. Luego de incubación durante 60 a temperatura ambiente, el producto y el sustrato en cada reacción se separan utilizando un chip de microfluídica 12–sipper analizado en un LC3000® (ambos, Caliper Life Sciences).

La separación de producto y sustrato es optimizada seleccionando voltajes y presión utilizando el programa informático de optimización del fabricante. La conversión del sustrato se calcula a partir del electroforegrama utilizando el programa informático de análisis de pocillos HTS "HTS Well Analyzer" (Caliper Life Sciences).

Por añadidura, se puede analizar la actividad de proteasa de BACE1 *in vivo* en líneas celulares las cuales expresan sustratos de BACE1 tal como APP, o en ratones transgénicos los cuales expresan sustratos de BACE1, tales como APP humana, según lo descrito en los Ejemplos 2(C) y 4.

Adicionalmente, se puede analizar la actividad de proteasa de BACE1 con anticuerpos anti–BACE1 en modelos animales. Por ejemplo, modelos animales de diversas enfermedades y trastornos neurológicos, y técnicas asociadas para examinar los procesos patológicos asociados con estos modelos, están fácilmente disponibles en la técnica. Los modelos animales de diversos trastornos neurológicos incluyen tanto animales no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Modelos de animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, modelos de roedores, *por ej.,* modelos murinos. Dichos modelos pueden ser generados introduciendo células en ratones singeneicos utilizando técnicas estándar, *por ej.* inyección subcutánea, inyección de vena de cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, e implante bajo la cápsula renal. Los modelos in vivo incluyen modelos de accidente cerebrovascular/ isquemia cerebral, modelos *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas, tales como modelos de ratón de enfermedad de Parkinson; modelos de ratón de enfermedad de Alzheimer; modelos de ratón de esclerosis lateral amiotrófica; modelos de ratón de atrofia muscular espinal; modelos de ratón/ rata de isquemia cerebral focal y global, por ejemplo, modelos de oclusión de arteria carótida común o de oclusión de arteria cerebral media; o en cultivos de embriones enteros ex vivo. Como un ejemplo no limitativo, existe una cantidad de modelos de ratón conocidos en la técnica para la enfermedad de Alzheimer ((*ver, por ej.* Rakover *et al.*, *Neurodegener. Dis.* (2007); 4(5): 392–402; Mouri *et al.*, *FASEB J.* (2007) Jul;21 (9): 2135–48; Minkeviciene *et al* ., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004) Nov; 311 (2) :677–82 y Yuede *et al.*, *Behav Pharmacol.* (2007) Sep; 18 (5–6): 347–63). Pueden efectuarse diversos ensayos en formatos de ensayo *in vitro* o *in vivo* conocidos, como es conocido en la técnica y descrito en la bibliografía técnica. Diversos modelos animales están disponibles también de vendedores comerciales tales como el Jackson Laboratory. Ensayos de modelos animales adicionales son descritos en los Ejemplos 4 y 5.

D. Inmunoconjugados

La invención también provee inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti–BACE1 de la presente invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (*por ej.,* toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, vegetal o animal o sus fragmentos), o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo–fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) en el cual un anticuerpo es conjugado a uno o más fármacos, incluyendo aunque sin limitarse a un maytansinoide (ver Patentes Estadounidenses Nos. 5.208.020, 5.416.064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las Patentes Estadounidenses Nos. 5.635.483 y 5.780.588, y 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (ver las Patentes Estadounidenses Nos. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336–3342 (1993); y Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925–2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477–523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358–362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717–721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829–834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529–1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336–4343 (2002); y Patente Estadounidense No. 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo según lo descrito en esta invención conjugado a una toxina enzimáticamente activa o su fragmento, incluyendo aunque sin limitarse una cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa–sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP–S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo según lo descrito en esta invención conjugado a un átomo radiactivo para formar un

radioconjugado. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado es empleado para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo tc99m o I123, o un marcado de espín para toma de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como toma de imágenes de resonancia magnética, mri (por sus siglas en inglés), tal como yodo–123 nuevamente, yodo–131, indio–111, flúor–19, carbono–13, nitrógeno–15, oxígeno–17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden ser preparados utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N–succinimidil–3–(2–piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil–4–(N–maleimidometil) ciclohexano–1–carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis–azido (tales como bis (p–azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis–diazonio (tales como bis–(p–diazoniobenzoil)–etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6–diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis–activos (tales como 1,5–difluor–2,4–dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede ser preparada según lo descrito en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1–isotiocianatobencil–3–metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX–DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El ligante puede ser un "ligante disociable" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un ligante lábil al ácido, ligante sensible a peptidasa, ligante fotolábil, ligante de dimetilo o ligante que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127–131 (1992); Patente Estadounidense No. 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADCs de esta invención contemplan expresamente, aunque sin limitarse a, conjugados preparados con reactivos entrecruzadores que incluyen, aunque sin limitarse a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC–SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo–EMCS, sulfo–GMBS, sulfo–KMUS, sulfo–MBS, sulfo–SIAB, sulfo–SMCC, y sulfo–SMPB, y SVSB (succinimidil–(4–vinilsulfona)benzoato) los cuales están disponibles comercialmente (*por ej.,* de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., E.E.U.U.).

E. Métodos y Composiciones para Diagnóstico y Detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención es útil para detectar la presencia de BACE1 en una muestra biológica. El término "detectar" en el presente contexto abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, moco, fluido cerebroespinal, fluido linfático, tejido neuronal, tejido cerebral, tejido cardíaco o tejido vascular.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presente de BACE1 en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–BACE1 según lo descrito en esta invención bajo condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti–BACE1 a BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti–BACE1 y BACE1. Ese tipo de método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se emplea un anticuerpo anti–BACE1 para seleccionar sujetos elegibles para terapia con un anticuerpo anti–BACE1, *por ej.* donde BACE1 es un biomarcador para selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que pueden ser diagnosticados utilizando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades neurodegenerativas (incluyendo, aunque sin limitarse a, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, tauopatías (que incluyen, aunque sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (que incluyen, aunque sin limitarse a, encefalopatía espongiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, e insomnio fatal familiar), accidente cerebrovascular, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, síndrome de Paget, lesión cerebral traumática, parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (que incluyen, aunque sin limitarse a, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cereoidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne,

síndrome de Halervorden–Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch–Nyhan, y síndrome de Unverricht–Lundborg), demencia (que incluye, aunque sin limitarse a, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelosa).

En ciertas realizaciones, se proporciona anticuerpos anti–BACE1 etiquetados. Las etiquetas incluyen, aunque sin limitarse a, etiquetas o restos que son detectados directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminiscentes, y radiactivas), así como también restos, tales como enzimas o ligandos, que son detectados indirectamente, *por ej.,* a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, aunque sin limitarse a, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, y ^{131}I, fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, *por ej.,* luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente Estadounidense No. 4.737.456), luciferina, 2,3–dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β–galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, *por ej.,* glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa–6–fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas de espín, etiquetas de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti–BACE1 según lo descrito en esta invención son preparadas mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, aunque sin limitarse a: buffers tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3–pentanol; y m–cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o

inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*por ej.* complejos de Zn–proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables de esta invención incluyen adicionalmente a los agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP, por sus siglas en inglés), por ejemplo, glicoproteínas de haluronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGPs ejemplares y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se encuentran descritos en las Publicaciones de Patentes Estadounidenses Nos. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicoaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Los ejemplos de formulaciones de anticuerpos liofilizadas se describen en la Patente Estadounidense No. 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 6.171.586 y WO2006/044908, éstas últimas formulaciones mencionadas incluyendo un buffer de histidina- acetato.

La formulación de esta invención puede contener además más de un ingrediente activo según lo necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afectan adversamente una a la otra. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli–(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas son descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ta edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en la forma de artículos conformados, *por ej.* películas, o microcápsulas.

Las formulaciones a ser empleadas para la administración in vivo son generalmente estériles. La esterilidad puede ser fácilmente lograda, por ej., mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Métodos Terapéuticos y Composiciones

Puede emplearse cualquiera de los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención en los métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (*por ej.,* EA). En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en un método de tratamiento. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti–BACE1. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en la reducción o inhibición de la formación de placas amiloideas en un paciente que corre el riesgo de padecer o sufrir de una enfermedad o trastorno neurológico (*por ej.,* EA). En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo anti–BACE1 para utilizar en un método de reducción o inhibición de la producción de Aβ en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti–BACE1. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas es preferentemente un ser humano. En cierto aspecto, el anticuerpo anti–BACE para utilizar en los métodos de la invención reduce o inhibe la actividad de BACE1. Por ejemplo, el anticuerpo anti–BACE1 reduce o inhibe la capacidad de BACE1 de disociar APP.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti–BACE1 en la manufactura o preparación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de enfermedades o trastorno

neurológicos. En una realización adicional, el medicamento es para utilizar en un método para tratar una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico una cantidad eficaz del medicamento. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional, *por ej.,* según lo descrito más adelante. En una realización adicional, el medicamento es para inhibir la actividad de BACE1. En una realización adicional, el medicamento es para utilizar en un método para inhibir la producción de Aβ o formación de placas en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para inhibir la producción de Aβ o formación de placas. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar la enfermedad de Alzheimer. En una realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene EA una cantidad eficaz de un anticuerpo anti–BACE1. En una realización de ese tipo, el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de por lo menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención, *por ej.,* para utilizar en cualquiera de los métodos terapéuticos antes mencionados. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti–BACE1 proporcionados en esta invención y por lo menos un agente terapéutico adicional, *por ej.,* según lo descrito más adelante.

Los anticuerpos de la invención pueden ser empleados ya sea por sí solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser coadministrado con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Dichas terapias de combinación antes señaladas abarcan la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos son incluidos en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo

caso, la administración de anticuerpo de la invención puede ocurrir antes, en forma simultánea, y/o luego de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante. Los anticuerpos de la invención también pueden emplearse en combinación con terapia de radiación.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede ser administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier ruta adecuada, *por ej.* por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en esta invención diversos programas de dosificación incluyendo aunque sin limitarse a administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos en el tiempo, administración por bolo e infusión de pulsos.

Ciertas realizaciones de la invención proporcionan el anticuerpo o fragmento del mismo para atravesar la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo o fragmento activo del mismo pueda ser fácilmente introducido en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen diversos enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de la misma, que incluyen, aunque sin limitarse a, métodos físicos, métodos a base de lípidos, y métodos a base de receptores y canales.

Los métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmento del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, aunque sin limitarse a, circunvenir la barrera hematoencefálica por completo, o creando aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de circunvención incluyen, aunque sin limitarse a, inyección directa en el cerebro (ver *por ej.,* Papanastassiou *et al.*, *Gene Therapy* 9: 398–406 (2002)) e implante de un dispositivo de administración en el cerebro (ver *por ej.,* Gill *et al.*, *Nature Med.* 9: 589–595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, aunque sin limitarse a, ultrasonido (ver *por ej.,* Publicación de Patente Estadounidense No. 2002/0038086), presión osmótica (*por ej.,* por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood–Brain Barrier y its Manipulation, Tomos 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización por, *por*

ej., bradiquinina o permeabilizante A–7 (ver *por ej.,* Pat. E.E.U.U. Nos. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que traspasan la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo (ver *por ej.,* Publicación de Patente Estadounidense No. 2003/0083299).

Los métodos a base de lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, aunque sin limitarse a, encapsular el anticuerpo o fragmento del mismo en liposomas que están acoplados a fragmentos de unión al anticuerpo que se unen a receptores sobre el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (ver *por ej.,* Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20020025313), y recubrir el anticuerpo fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteínas de baja densidad (*ver por ej.,* Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20040204354) o apolipoproteína E (*ver por ej.,* Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20040131692).

Los anticuerpos de la invención serían formulados, dosificados, y administrados en forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores conocidos por los practicantes médicos. El anticuerpo debe ser, aunque es opcionalmente formulado con uno o más agentes actualmente empleados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de ese tipo de otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se emplean generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración según lo descrito en esta invención, o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosificaciones descritas en esta invención, o en cualquier dosificación mediante cualquier ruta que sea empírica/ clínicamente determinada como apropiada.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se emplea por sí solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo es administrado con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la

discreción del médico interviniente. El anticuerpo es adecuadamente administrado al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (*por ej.* 0,1 mg/kg– 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento generalmente sería sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar del anticuerpo estaría en el rango entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de los mismos) pueden ser administradas al paciente. Dichas dosis pueden ser administradas intermitentemente, *por ej.* cada semana o cada tres semanas (*por ej.* de modo que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte, o *por ej.* alrededor de seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguido por una o más dosis inferiores. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia es fácilmente monitoreado mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos antes mencionados pueden llevarse a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti–BACE1.

H. Artículos de Manufactura

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de manufactura comprende un contenedor y una etiqueta o inserto de paquete en el contenedor o asociado con el mismo. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los contenedores pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor sostiene una composición la cual es por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa o un frasco de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección

hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o inserto de paquete indica que la composición es empleada para tratar la afección de elección. Asimismo, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo, donde la composición comprende un agente citotóxico adicional u otro agente terapéutico. El artículo de manufactura en esta realización de la invención puede comprender además un inserto de paquete que indique que las composiciones pueden ser empleadas para tratar una afección en particular. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) contenedor que comprende un buffer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros buffers, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de manufactura antes mencionados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo anti–BACE1.

III EJEMPLOS

Lo que sigue son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden llevarse a la práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLO 1: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI–BACE1

Los anticuerpos que se unen específicamente a BACE1 fueron generados por inmunoadsorción de dos tipos diferentes de genotecas de anticuerpos con exhibición de fagos (una con diversidad natural (VH y VH/VL), la otra con diversidad en ciertas regiones CDR artificialmente restringidas a conjuntos de aminoácidos en particular (YSGX)) contra el dominio extracelular de BACE1 humano, los aminoácidos 1–457 de SEC ID NO: 49.

A. Clasificación y Screening de Genotecas de Diversidad Natural para Identificar Anticuerpos Anti–BACE–1

Selección de clones anti-BACE1 exhibidos en fagos

Se empleó BACE-1 humana biotinilada (1–457 de SEC ID NO: 49) como un antígeno para la clasificación de genotecas. Las genotecas de fagos de diversidad natural se clasificaron cinco rodas contra BACE-1 biotinilada precapturada sobre placas de neutravidina/estreptavidina alternantes. Para la primera ronda de clasificación, inmunoplacas NUNC 96 pocillos Maxisorp fueron recubiertas en primer lugar con 10 μg/mL de neutravidina (Fisher Scientific, #21125) y bloqueadas con buffer de bloqueo de fago PBST (solución salina tamponada con fosfato (PBS) y 1% (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,05% (v/v) Tween 20) durante toda la noche. En primer lugar, 10 μg/mL de BACE-1 biotinilada se capturó sobre las inmunoplacas durante 30 minutos. Las genotecas en fago de anticuerpos VH (*ver por ej.,* Lee *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 284:119–132 (2004)) y VH/VL (ver Liang *et al.*, *J. Mol. Biol.* 366: 815–829 (2007)), prebloqueadas con buffer de bloqueo de fago PBST, fueron agregadas posteriormente a las placas e incubadas durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 10 veces al día siguiente con PBT (PBS con 0.05% Tween 20), y el fago unido fue eluido con 1 mL de HCl 50 mM y NaCl 500 mM durante 30 min y neutralizado con 600 μL de base de Tris 1 M (pH 8.0). El fago recuperado se amplificó en células XL–1 Blue de *E. coli.* Durante las subsiguientes rondas de selección, las genotecas de fago propagadas se preabsorbieron en primer lugar con 50 μl de Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 (Invitrogen, # 65601) en PBST/BSA y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las partículas de fago que se unieron a neutravidina fueron sustraídas del material inicial de fago con la eliminación de las Dynabeads®. Luego, el fago no unido fue agregado a antígeno de BACE–1 exhibido sobre placas de estreptavidina y el tiempo de incubación fue reducido a 2–3 horas. Se aumentó gradualmente la severidad del lavado de las placas.

Luego de 5 rondas de inmunopurificación ("panning"), se observó un enriquecimiento significativo. Se seleccionaron 96 clones de la clasificación de genotecas de VH y VH/VL para determinar si se unían específicamente a BACE–1 humana. Las regiones variables de estos clones fueron secuenciadas por PCR para identificar clones de secuencia única. Se seleccionaron y reformatearon 42 anticuerpos de fago único que se unían a BACE–1 humana con por lo menos 5x

por sobre el fondo hasta IgGs de longitud completa para evaluación en ensayos celulares *in vitro*.

Los clones de interés fueron reformateados en IgGs por clonación de regiones V_L y V_H de clones individuales en los vectores LPG3 y LPG4, respectivamente, y expresados transitoriamente en células CHO de mamífero, y purificados utilizando cromatografía en columna de proteína A.

Selección de clones inhibidores anti–BACE1

BACE1 es una aspartil proteasa que normalmente disocia la proteína precursora del amiloide en un punto cercano a su dominio de transmembrana, cerca de la superficie de la célula. Por lo tanto, la capacidad de los anticuerpos identificados anteriormente de modular la actividad proteolítica de BACE1 en ciertos sustratos de BACE1, fue evaluada *in vitro* utilizando un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF, por sus siglas en inglés).

El ensayo de HTRF se realizó de la siguiente manera. Dos microlitros de 375 nM de Bi27 (Biotina–KTEEISEVNLDAEFRHDSGYEVHHQKL (SEC ID NO: 53), American Peptide Company)), un péptido de sitio de disociación de BACE1 de proteína precursora del amiloide que lleva una sustitución para aumentar la sensibilidad a la disociación de BACE1, se combinó con 3 µL de BACE1 125 nM preincubada con un anticuerpo anti–BACE en buffer de reacción de BACE (acetato sódico 50 mM pH 4.4 y 0.1% CHAPS) en una placa de 384 pocillos (Proxiplate™, Perkin–Elmer). La mezcla de reacción proteolítica se incubó a temperatura ambiente durante 75 minutos y se templó mediante la adición de 5 µL de mezcla de detección de HTRF que contenía 2 nM de Estreptavidina–D2 y 150 nM de anticuerpo antiamiloide beta 6E10 (Covance, Emoryville, CA) etiquetado con criptato de Europio en buffer de detección (Tris 200 mM pH 8.0, EDTA 20 mM, 0.1% BSA, y 0.8M KF). La mezcla de reacción final se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos y se midió la señal de TR–FRET utilizando una Lectora de Placas EnVision Multilabel Plate Reader™ (Perkin–Elmer) a una longitud de ondas de excitación de 320 nm y longitudes de ondas de emisión de 615 y 665 nm. Las reacciones que carecían de enzima BACE1 (0 BACE) y las reacciones que contenían anticuerpos anti–BACE1 (PBS (100% de Actividad de BACE1) se utilizaron como controles.

De los 42 anticuerpos analizados los cuales fueron identificados de la genoteca de diversidad natural, el mejor inhibidor de BACE1, YW412.8, fue escogido para maduración por afinidad. Ver la Figura 4.

Maduración por afinidad de clones inhibidores anti–BACE1

Se construyeron genotecas para madurar por afinidad al anticuerpo YW412.8 de la siguiente manera. El fagémido pW0703 (derivado del fagémido pV0350–2b (Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340, 1073–1093 (2004)), que contenía un codón de detención (TAA) en las tres posiciones de CDR–L3 y que exhibía Fab monovalente sobre la superficie de bacteriófago M13) sirvió como el patrón de genoteca para injertar dominios variables (VH) de cadena pesada de clones de interés de la genoteca de diversidad natural para maduración por afinidad. Se emplearon ambas estrategias de aleatorización dura y blanda para la maduración por afinidad. Para la aleatorización dura, una genoteca de cadena liviana con posiciones seleccionadas de tres CDRs de cadena liviana se aleatorizó utilizando aminoácidos designados para imitar anticuerpos humanos naturales y la degeneración de ADN designada fue según lo descrito en Lee *et al.* (*J. Mol. Biol.* 340, 1073–1093 (2004)). Para la aleatorización blanda, los residuos en posiciones 91–94, y 96 de CDR–L3, 28–31 y 34–35 de CDR–H1, 50, 52, y 53–58 de CDR–H2, 95–99 y 100A de CDR–H3, fueron buscados; y se seleccionaron para la aleatorización dos combinaciones diferentes de lazos de CDR, L3/H1/H2 y L3/H3. Para lograr las condiciones de aleatorización blanda, las cuales introducían el índice de mutación de aproximadamente 50% en las posiciones seleccionadas, se sintetizó ADN mutagénico con 70–10–10–10 mezclas de bases favoreciendo a los nucleótidos tipo salvaje (Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:1233–1251 (1994)).

La selección de Fabs mejorados por afinidad se realizó de la siguiente manera. Se sometieron genotecas de fago de mejora por afinidad a clasificación de placas para la primera ronda, seguido por cuatro o cinco rondas de clasificación en solución. Para la primera ronda de clasificación en placas, las genotecas se clasificaron contra 10 □g/ml de objetivo biotinilado (BACE1) capturado por placa recubierta con neutravidina (placa NUNC Maxisorp) con entrada de fago aproximadamente 2 OD/ml en 1% BSA y 0.05% Tween 20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de la primera ronda de clasificación en placas, se realizó la clasificación en solución para aumentar la severidad de la selección. Para la clasificación en solución, 1 OD/ml de fago propagado de la primera ronda de clasificación en placa se incubó con proteína objetivo biotinilada 100 nM (la concentración se basó en valores de IC50 de fago de clones progenitores) en 100µl de buffer que contenía 1% Superblock (Pierce Biotechnology) y 0.05% Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó adicionalmente 10x con 1% Superblock, y 100µl/pocillo se aplicó a pocillos recubiertos con neutravidina (5µg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente

con suave agitación de modo que fago unión al objetivo biotinilado. Los pocillos se lavaron con PBS y 0.05% Tween 20 diez veces. Para determinar la unión de fondo, los pocillos de control que contenían fago con objetivos que no eran biotinilados se capturaron en placas recubiertas con neutravidina. El fago unión se eluyó con HCl 0,1 N durante 20 minutos, se neutralizó por 1/10 volumen de Tris 1 M pH 11, se tituló, y propagó para la siguiente ronda. A continuación, se llevaron a cabo dos rondas más de clasificación en solución junto con aumento de la severidad de la selección. La primera ronda fue para la selección dentro del índice ("on–rate") disminuyendo la concentración de proteína objetivo biotinilada de 100 nM a 5 nM. La segunda ronda era para la selección fuera de índice ("off–rate") agregando cantidades en exceso de proteína objetivo no biotinilada (100 veces más) para eliminar por competición aglutinantes más débiles a temperatura ambiente. Asimismo, se redujo la entrada de fago (0.1~0.5 OD/ml) para reducir la unión de fago de fondo.

Se escogieron colonias de los screens de la cuarta ronda y se cultivaron durante la noche a 37ºC en 150 µl/pocillo de medio 2YT con 50 µg/ml de carbenicilina y 1E10/ml de fago KO7 en placas de 96 pocillos (Falcon). De la misma placa, se escogió una colonia de fago parental infectado XL–1 como un control. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de neutravidina (2 µg/ml) en PBS a 4ºC durante toda la noche o temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 65 µl de 1% BSA durante 30 min y 40µl de 1% Tween 20 durante otros 30 minutos antes del agregado de proteína objetivo biotinilada (2 µg/ml) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

El sobrenadante del fago se diluyó 1:10 en buffer de ELISA (ensayo de inmunoabsorbencia vinculado con enzima) (PBS con 0.5% BSA, 0.05% Tween20) con o sin proteína objetivo 10 nM en 100 µl volumen total y se incubó por lo menos 1 hora a temperatura ambiente en una placa F (NUNC) para utilizar en un ensayo de competición de punto único. Se transfirieron 75 µl de mezcla con o sin proteína objetivo lado a lado a la proteína objetivo capturada por placas recubiertas con neutravidina. La placa se agitó suavemente durante 15 min para permitir la captura de fago no unido a la proteína objetivo capturada en neutravidina. La placa se lavó por lo menos cinco veces con PBS–0.05% Tween 20. La unión se cuantificó agregando anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en buffer de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS–0.05% Tween 20 por lo menos cinco

veces. Luego, se agregaron al pocillo 100 µl/pocillo de una relación 1:1 de sustrato de 3,3',5,5'–tetrametilbenzidina (TMB) Peroxidasa y Solución B de Peroxidasa (H_2O_2) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 100 µl de ácido fosfórico 1 M (H_3PO_4) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la DO (densidad óptica) del color amarillo en cada pocillo utilizando un lector de placas de ELISA estándar a 450 nm. Se calculó la reducción de DO (%) mediante la siguiente ecuación:

reducción de DO_{450nm} (%) = [(DO_{450nm} de pocillos con competidor) / (DO_{450nm} de pocillo sin competidor alguno)]*100.

En comparación con la reducción de DO_{450nm} (%) del pocillo de fago parental (100%), los clones que tenían la reducción de DO_{450nm} (%) más baja que 50% para tanto el objetivo humano como el murino se escogieron para análisis de secuencias. Se seleccionaron clones únicos para preparación de fago para determinar la afinidad de unión (IC_{50} de fago) contra objetivo mediante comparación con clones parenterales. La mayoría de los clones mejorados por afinidad fueron reformateados en IgG1 humana para producción de anticuerpos y adicional análisis cinético de unión por resonancia de plasmón superficial utilizando BIAcore y otros ensayos *in vitro* o *in vivo*.

La secuencia de la región HVR de cadena liviana y cadena pesada de YW412.8, escogida de la genoteca de fago de diversidad natural, se muestra en las Figuras 1(A) y 1(B). Adicionalmente, se secuenciaron también cinco anticuerpos obtenidos de la maduración por afinidad del anticuerpo YW412.8 y las secuencias de HVR de cadena liviana y cadena pesada son también mostradas en las Figuras 1(A) y 1(B). Las secuencias de aminoácidos de consenso de las regiones HVR de cadena liviana que exhibieron variabilidad en estos anticuerpos fueron: HVR–L1: Arg Ala Ser Gln X_1 Val X_2 X_3 X_4 X_5 Ala (SEC ID NO: 17), donde X_1 se selecciona entre ácido aspártico y valina, X_2 se selecciona entre serina y alanina, X_3 se selecciona entre treonina y asparagina, X_4 se selecciona entre alanina y serina, y X_5 se selecciona entre valina y leucina; HVR–L2: X_6 Ala Ser Phe Leu Tyr Ser (SEC ID NO: 18), donde X_6 se selecciona entre serina y leucina; y HVR–L3: Gln Gln X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11} X_{12} Thr (SEC ID NO: 19), donde X_7 se selecciona entre serina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico y tirosina, X_8 se selecciona entre tirosina, prolina, serina y alanina, X_9 se selecciona entre treonina y asparagina, X_{10} se selecciona entre treonina, tirosina, ácido aspártico y serina, X_{11} se selecciona entre prolina y leucina y X_{12} se selecciona entre prolina y

treonina. Solamente la región hipervariable de cadena pesada H1 exhibió variabilidad entre estos anticuerpos, y la secuencia de consenso para esa región era: HVR–H1: Gly Phe Thr Phe X_{13} Gly Tyr X_{14} Ile His (SEC ID NO: 26), donde X_{13} se selecciona entre serina y leucina y X_{14} se selecciona entre alanina y glicina.

B. Clasificación y Screening de Genotecas de Diversidad Sintética para Identificar Anticuerpos Anti–BACE–1

Las genotecas de anticuerpos sintéticas minimalistas con diversidad química restringida en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) han sido construidas y se ha demostrado que son eficaces para obtener aglutinantes de anticuerpos de alta afinidad contra una variedad de proteínas según lo descrito previamente en Fellouse, F.A. *et al. J. Mol. Biol.* 373: 924–940 (2007). Una genoteca de diversidad sintética, designada la genoteca YSGX, se utilizó para buscar un anticuerpo inhibidor contra BACE1 mediante clasificación en solución. La inmunopurificación ("panning") para unión se llevó a cabo para cinco rondas según lo descrito más adelante.

La genoteca para la clasificación primaria, designada genoteca YSGX, se construyó según lo descrito previamente utilizando un fagémido para exhibición en fago de Fab (pF1359) (Genoteca D en Fellouse, F.A. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 373: 924–940 (2007)). La diversidad de la genoteca era de aproximadamente 2×10^{10}.

Para la maduración por afinidad, las tres CDRL se aleatorizaron con CDRH fija para clones seleccionados derivados de la clasificación primaria. Se emplearon tres tipos de oligonucleótidos para la aleatorización. Tipo I emplea el codón de degeneración TMC que codifica solamente Tyr y Ser. Tipo II emplea una mezcla de fosforamidita trímero habitual que contiene codones para Tyr, Ser, Gly y Trp en relaciones equimolares. Tipo III emplea una mezcla de trímero y fosforamidita que codifica para 10 residuos de aminoácidos en las siguientes relaciones molares: Tyr (30%), Ser (15%), Gly (15%), Trp (10%) y Phe, Leu, His, Asp, Pro, Ala, 5% cada uno. Se introdujo una mutación en los oligonucleótidos empleados para CDR–L3 de modo que el sitio *Kpn*I en el patrón original fue silenciado luego de la mutagénesis. La variación de la longitud fue de 3 a 10 aminoácidos para CDR–L1, 7 aminoácidos para CDR–L2, y de 2–10 aminoácidos para CDR–L3. Los oligonucleótidos fueron agrupados en conjunto apropiadamente para preparar el conjunto final de oligonucleótidos, es decir, mezcla de todos los oligonucleótidos L1, L2 y L3 con diferente longitud dentro de un tipo y luego mezcla de los tres tipos en forma conjunta como el conjunto de oligonucleótidos para CDR–L1, CDR–L2 y CDR–L3, respectivamente. Se empleó la mutagénesis de Kunkel para reemplazar

todas las posiciones de CDR–LC. Después de la mutagénesis de Kunkel (Kunkel, T.A. *et al.*, *Methods Enzymol.* 154: 367–382 (1987)), el ADN fue purificado y tratado con *Kpn*I a 37°C durante 3 h para digerir el ADN patrón. Luego, el ADN purificado fue sometido a electroporación para la construcción de genotecas.

Selección de clones anti-BACE1 exhibidos en fago

Se empleó BACE-1 humana biotinilada (1–457 de SEC ID NO: 49) como un antígeno para la clasificación de genotecas. Para la primera ronda de inmunopurificación ("panning"), se incubaron 20 □g de BACE1 biotinilada con 1 ml de la genoteca a una concentración de 1 x 10^{13} pfu/ml a 4°C durante 1,5 h. Se capturaron los fagos que se unían al objetivo durante 15 min con 200 □l Dynabeads® MyOne Estreptavidina que habían sido previamente bloqueados con buffer de Bloqueo (PBS, 0.5%(p/v) seroalbúmina sérica). Se eluyó el fago unión con HCl 0.1 M y se neutralizó inmediatamente con base de Tris 1 M. El fago eluido fue amplificado siguiendo el protocolo estándar según lo descrito previamente (Sidhu, S.S. *et al. Methods Enzymol.* 328: 333–363 (2000)). La segunda ronda se llevó a cabo al igual que la primera ronda empleando 10 □g de BACE1 biotinilada incubada con 400 □l de fago amplificado. Para todas las rondas subsiguientes, se incubaron 2 □g de BACE1 biotinilada con 400 □l de fago amplificado. El fago que se unía a BACE1 biotinilada se capturó durante 15 min utilizando inmunoplacas Maxisorp Immunoplates (NUNC) que habían sido previamente recubiertas con Neutravidina o Estreptavidina (alternativamente entre rondas) y bloqueadas con buffer de Bloqueo.

Después de cinco rondas de selección, el fago fue producido de clones individuales cultivados en un formato de 96 pocillos y los sobrenadantes de cultivo se diluyeron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,5% (p/v) seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma–Aldrich, St Louis, MO), 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma–Aldrich) (buffer PBT) para utilizar en un ELISA SPOT de fago. Los sobrenadantes de fago diluidos se incubaron durante 1 h con BACE1 biotinilada que fue inmovilizada en Inmunoplacas de 384 pocillos recubiertas con Neutravidina Maxisorp Immunoplates (NUNC). Las placas se lavaron seis veces con PBS, 0.05% (v/v) Tween 20 (buffer PT) y se incubaron durante 30 min con conjugado de peroxidasa de rábano picante / anticuerpo anti-M13 (dilución 1:5000 en buffer de PBT) (GE Healthcare). Las placas se lavaron seis veces con buffer de PT y dos veces con PBS, se desarrollaron durante 15 min con sustrato de 3,3',5,5'–tetrametilbenzidina/H_2O_2 peroxidasa (Kirkegaard–Perry Laboratories), se

templaron con H_3PO_4 1.0 M y se leyó la absorbancia espectrofotométricamente a 450 nm.

Selección de clones inhibidores anti–BACE1

La inmunopurificación ("panning") de la genoteca YSGX dio como resultado la identificación de 18 clones únicos los cuales se unen a BACE1. Ver la Figura 3. Las proteínas Fab correspondientes a estos clones se purificaron de la siguiente manera. Se introdujo un codón de detención entre la cadena pesada y el gen 3 en el fagémido que codifica el Fab. El fagémido resultante se transformó en la cepa 34B8 de *E. coli*. Se cultivó una sola colonia durante toda la noche a 37°C en 30 ml de medio LB suplementado con 50 □g/ml de carbenicilina. El cultivo hasta el día siguiente (5 ml) se inoculó en 500 ml de medio C.R.A.P. completo suplementado con carbenicilina (50 □g/ml) y cultivado a 30°C durante 24 h. Las proteínas Fab se purificaron utilizando perlas de agarosa de proteína A mediante métodos convencionales.

Los Fabs purificados fueron seleccionados para actividad inhibidora contra BACE1 utilizando un ensayo de actividad enzimática de HTRF según lo descrito anteriormente. Fabs 2, 5, 8, 12, 14 y 19 fueron identificados como inhibidores de BACE1 y Fab 23 identificado como un activador. Ver la Figura 5.

Fabs 2, 5, 8, 12, 14 y 19 fueron adicionalmente caracterizados para determinar su epítopo de unión. El panel de Fabs purificados para los 6 anticuerpos se empleó para competir con el fago d exhibición de Fabs individual unido a BACE1 capturado por placas en un ELISA de competición de fagos según lo descrito más abajo.

Se recogieron colonias únicas (en células XL1) de los clones seleccionados y se cultivaron en 1 ml de caldo de cultivo 2YT suplementado con 50 □g/ml de carbenicilina, 10 □g/ml de tetraciclina y M13KO7 a 37°C durante 2 h. Se agregó kanamicina (25 □g/ml) al cultivo, el cual continuó creciendo durante 6 h. El cultivo fue transferido a 30 ml de caldo de cultivo 2YT suplementado con 50 □g/ml de carbenicilina y 25 □g/ml de kanamicina y cultivado a 37°C durante toda la noche. El fago se recolectó y purificó según lo descrito previamente (Sidhu, S.S. *et al. Methods Enzymol.* 328: 333–363 (2000)). El fago que exhibía Fabs purificado se diluyó seriadamente en buffer de PBT y se analizó para determinar la unión a BACE1 inmovilizada sobre una placa. Se seleccionó una concentración de fago fija que proporciona 80% de señales de saturación para el ELISA de competición subsiguiente. La competición se llevó a cabo incubando el fago que exhibía Fabs de subsaturación con diluciones seriadas de BACE1 durante 1 h y luego se

trasfirió a la placa de BACE1 inmovilizada durante 15 min para capturar el fago no unido. Luego, la placa se lavó 8 veces y el fago unido se detectó mediante HRP anti-M13.

Fab 5 purificado era competitivo con la unión de BACE1 a Fabs 8 y 12 exhibidos en fago, pero no con Fabs 2, 14 y 19. En forma consistente con esta información, el Fab 8 purificado era competitivo con Fabs 5 y 12 exhibidos en fago. Tomados en conjunto, estos datos indican que Fabs 5, 8 y 12 se unen a los mismos epítopos o a epítopos superpuestos en BACE1. Los Fabs 14 y 19 también fueron competitivos entre sí en base al hecho de que cualquiera de estos dos Fabs purificados era competitivo con fago que exhibía Fab 14 y 19. Esto sugirió que estos dos anticuerpos se unen al mismo epítopo o a epítopo superpuesto, lo cual difiere de aquel o aquellos para los Fabs 5, 8 y 12. En el ensayo de ELISA con fagos, el fago que exhibía Fab 2 no pudo ser eliminado por competición por ninguna de las proteínas de Fab purificadas, incluyendo el Fab 2 mismo, lo cual sugiere que la unión entre Fab 2 y BACE1 era no específica. Por consiguiente, el Fab 2 fue excluido como un candidato para la maduración por afinidad.

Maduración por afinidad de clones inhibidores anti–BACE1

Para mejorar la afinidad de unión de los anticuerpos inhibidores progenitores obtenidos por el proceso de inmunopurificación inicial, nuevas genotecas de fagos fueron designadas que aleatorizaban las tres CDR–LC de Fabs 5, 8, 12, 14 y 19. Estos cinco anticuerpos fueron divididos en dos subgrupos en base a sus diferentes epítopos – Fabs 5, 8 y 12 como grupo 1 y Fabs 14 y 19 como grupo 2. Se purificó ADN de una sola hebra (ssDNA) para clones individuales como patrones para la construcción de genotecas. Los patrones de ssDNA del grupo 1 se agruparon en forma conjunta para la genoteca 1 de maduración por afinidad (designada LC–lib1), y el grupo 2 agrupado para la genoteca 2 (LC–lib2). La diversidad química fue restringida dentro de las CDRs aleatorizadas en base a la capacidad funcional de los aminoácidos naturales para el reconocimiento molecular. Ver Birtalan, S. *et al. Mol Biosyst.* 6:1186–1194 (2010). La diversidad minimalista (codón binario Tyr y Ser), diversidad semi–minimalista (codón ternario Tyr, Ser, Gly y Trp) y diversidad adicional con 10 aminoácidos involucrados se mezclaron a fin de lograr elevada afinidad. Dos genotecas de maduración por afinidad, LC–lib1 y LC–lib2, fueron construidas empleando el mismo conjunto de grupos de oligonucleótidos para aleatorizar las tres CDR–LC simultáneamente según lo descrito anteriormente. Para la maduración por afinidad, las tres CDR–LC (Región Determinante de

Complementariedad – Cadena Liviana) fueron aleatorizadas con CDR–HC (Región Determinante de Complementariedad – Cadena pesada) fija para clones seleccionados derivados de la clasificación primaria.

El screening de las genotecas para la maduración por afinidad de anticuerpos inicialmente obtenidos se llevó a cabo similarmente según lo descrito anteriormente. Las genotecas fueron clasificadas con BACE1 biotinilada en solución durante 3 rondas, lo cual dio como resultado un enriquecimiento en la unión de más de 100 veces. Para la ronda 1, se incubaron 2 □g de biotina–BACE1 con la genoteca de Fabs exhibidos en fago. Para las rondas 2 y 3, se incubó BACE1 biotinilada 20 nM y 5 nM con fago amplificado, respectivamente. Los clones (96) de cada una de las dos genotecas se seleccionaron en un ELISA de competición de un punto, donde se emplearon 20 nM de BACE1 en solución para competir con la partícula de fago de la unión a BACE1 de placa inmovilizada según lo descrito más adelante.

Una placa inmovilizada con BACE1 se preparó capturando 2 □g/ml de BACE1 biotinilada durante 15 min utilizando una inmunoplaca de 384 pocillos Maxisorp Immunoplate que fue previamente recubierta con 2 □g/ml de Neutravidina a 4°C durante toda la noche y se bloqueó con Buffer de Bloqueo. Los sobrenadantes del cultivo de clones individuales cultivados en un formato de 96 pocillos se diluyeron 20 veces en buffer de PBT y se incubó con o sin 20 nM de BACE1 a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla fue transferida a la placa con BACE1 inmovilizada y se incubó durante 15 min. La placa se lavó seis veces mediante buffer PT y el fago unido fue detectado mediante HRP anti-M13 según lo descrito anteriormente. La relación entre la señal de ELISA del pocillo en ausencia y presencia de BACE1 en solución indica la afinidad del clon, donde las relaciones más altas indican las afinidades más altas.

Cinco clones de LC_lib1 tenían una relación de >4 entre la señal de ELISA del pocillo en ausencia de BACE1 y la señal de ELISA del pocillo en presencia de BACE1 y un clon de LC_lib2 con relación > 3. Dos clones, designados LC4 y 11, fueron derivados de Fab5; tres clones, LC6, LC9 y LC10, de Fab 12, y LC40 de Fab14 (Figura 6).

Para estimar la afinidad de estos 6 clones, se realizaron ELISAs de competición con fago, según lo descrito anteriormente, y se determinaron los valores de IC_{50} (Figura 7). Los valores IC_{50} se determinaron ajustando los datos a una ecuación logística de cuatro parámetros desarrollada por Marquardt

(Marquardt, D. W. *SIAM J. Appl. Math.* 11: 431–441 (1963)) utilizando Kaleidagraph (Synergy Software) y se muestran a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

FabID	IC50 nM	Mejora de afinidad en N° de veces
Fab5*	20.7 ± 9.5	1
LC4	0.46 ± 0.07	45
LC11	0.88 ± 0.14	24
Fab12*	45.3 ± 31	1
LC9	0.12 ±0.02	378
LC10	0.12 ± 0.01	378
LC6	0.12 ±0.02	156
Fab14*	14.3 ± 2.5	1
LC40	4.7 ± 0.7	3

* progenitor

Todos los clones LC de hecho mostraron afinidad mejorada en comparación con sus respectivos progenitores. Notablemente, la introducción de dos residuos Trp en CDR–L2, mejoró la afinidad de derivados de Fab 12 en más de 100 veces con respecto al progenitor.

Las proteínas Fab de 6 clones se purificaron y se sometieron a ensayo de actividad enzimática por HTRF, según lo descrito anteriormente. OM99–2 (CalBiochem®, catálogo #496000), un inhibidor peptídico de BACE1, se utilizó como un control. Para los anticuerpos con Fab 5 como progenitor, Fab LC 4 mostró una inhibición mejorada significativa, mientras que LC11 perdió actividad de inhibición. LC 40, derivado de Fab14, también perdió su actividad de inhibición. Los derivados con afinidad mejorada de Fab 12, Fabs LC 6, LC 9 y LC10, en general mostraron una mejora de aproximadamente 20 veces en su actividad de inhibición (Figura 8). En base a este ensayo, Fab LC 6 fue el mejor inhibidor y mostró una inhibición de casi el 100% de la actividad enzimática, mientras que otros Fabs eran inhibidores parciales, con un grado de inhibición de aproximadamente 60–70% (Figura 8). Los valores de IC_{50} para los diversos Fabs analizados se muestran a continuación en la Tabla 3. La IC_{50} OM99–2 fue 11nM en este ensayo.

TABLA 3

Fab ID	IC50 (nM)
Fab5*	130
LC4	480
LC11	n.d.
Fab12*	n.d.
LC9	140
LC10	180
LC6	160
Fab14*	740
LC40	n.d.
***progenitor**	

La secuencia de las regiones HVR de cadena liviana y pesada de Fab12 se muestra en las Figuras 2(A) y 2(B). La secuencia de HVR de cadena liviana y pesada de tres anticuerpos producidos mediante maduración por afinidad de Fab 12 también se muestra en las Figuras 2(A) y 2(B). Solamente la HVR–L2 de cadena liviana exhibió variabilidad en estos anticuerpos: HVR–L2: X_{15} Ala Ser X_{16} Leu Tyr Ser (SEC ID NO: 41), donde X_{15} se selecciona entre serina, triptófano y tirosina y X_{16} se selecciona entre serina y triptófano. Cada una de las tres regiones HVR de cadena pesada era idéntica en los cuatro anticuerpos.

Los Fabs fueron clonados como anticuerpos IgG para utilizar en otras aplicaciones de la siguiente manera. Los dominios variables de cadena liviana y cadena pesada de los Fabs seleccionados se clonaron en un plásmido basado en pRK5 con dominio constante de cadena liviana o cadena pesada humana (IgG1 humana) para la expresión de IgG transitoria en célula 293T o células de ovario de hámster Chino (CHO). Las proteínas de IgG se purificaron empleando perlas de agarosa de proteína A mediante métodos estándares.

EJEMPLO 2: CARACTERIZACIÓN ADICIONAL DE ANTICUERPOS ANTI–BACE1

Según lo descrito anteriormente los anticuerpos fueron identificados en términos de función y unión al epítopo en BACE1. Los anticuerpos progenitores y madurados por afinidad fueron adicionalmente caracterizados empleando los ensayos descritos a continuación.

A. Cinética de Unión

Se evaluó la cinética de unión de YW412.8.31. Brevemente, se midieron las afinidades de unión de IgGs anti–BACE1 mediante resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) utilizando un instrumento BIAcore™–3000. Se capturó IgG humana anti-BACE1 YW412.8.31 mediante anticuerpo Fc antihumano de ratón (GE Healthcare, cat# BR–1008–39) recubierto con chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 100 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones de la cinética, se inyectaron diluciones seriadas de dos veces (0.98 nM a 125 nM) de ECD de BACE1 humana o ECD de BACE1 murina (aminoácidos 1–457) en buffer de PBT (PBS con 0.05% Tween 20) a 25°C con un índice de flujo de 30 □l/min. Se calcularon los índices de asociación (k_{on}) y los índices de disociación (k_{off}) utilizando un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (Programa Informático de Evaluación BIAcore™ Evaluation Software versión 3.2). Se calculó la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la relación k_{off}/k_{on}. Los resultados de la unión de YW412.8.31 a pH 7.0 se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4 – Valores de cinética de unión para anticuerpos anti–BACE1 según lo medido por BIAcore™

ANTICUERPO	**TIPO DE BACE1**	**K_{ON} ($M^{-1}S^{-1}$)**	**K_{OFF} (S^{-1})**	**K_D (M)**
YW412.8.31	Humana	1.1×10^5 1.05×10^5	3.1×10^{-4} 1.39×10^{-4}	2.9×10^{-9} 1.32×10^{-9}
YW412.8.31	Ratón	1.4×10^5 1.01×10^5	2.9×10^{-4} 1.41×10^{-4}	2.1×10^{-9} 1.4×10^{-9}
YW412.8.31	Conejillo de Indias	1.0×10^5	2.7×10^{-4}	2.6×10^{-9}

La unión de YW412.8.31 a BACE1 fue confirmada a ambos pH 7.0 y 5.0. Esto es importante ya que BACE1 es óptimamente activa a pH ácido, supuestamente en vesículas endocíticas y/o la red del trans–Golgi.

B. Ensayos de Inhibición *In Vitro*

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para modular la actividad proteolítica de BACE1 sobre ciertos sustratos de BACE *in vitro* utilizando dos ensayos de actividad: el ensayo de HTRF y un ensayo electroforético capilar microfluídico (MCE) con el dominio extracelular recombinante humano de BACE1.

Se evaluó el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 madurado por afinidad en un ensayo de HTRF según lo descrito en el Ejemplo 1. Un inhibidor peptídico sintético de BACE1, OM99–2 (CalBiochem®, Catálogo # 496000), un inhibidor de pequeña molécula de BACE1 (inhibidor IV de β–Secretasa, CalBiochem®, Catálogo #5657688) y un anticuerpo IgG el cual no se une a BACE1 se emplearon como controles. Ver la Figura 9 (Panel A) (péptido largo). Adicionalmente, también se llevaron a cabo reacciones utilizando un péptido FRET corto (Rh–EVNLDAEFK–templador (SEC ID NO: 54), Invitrogen) de manera idéntica a las reacciones de HTRF. Los productos fluorogénicos resultantes de las reacciones de control se midieron como anteriormente, pero a una longitud de onda de excitación de 545 nm y una longitud de ondas de emisión de 585 nm. Los datos obtenidos fueron analizados empleando GraphPad Prism 5™ (LaJolla, CA). Ver la Figura 9 (Panel A) (péptido corto).

Las reacciones del ensayo MCE se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL por pocillo en una microplaca de 384 pocillos. Una reacción enzimática estándar, iniciada mediante la adición de 10 µL 2X de sustrato a 5 µL de 4x enzima y 5 mL de 4x compuesto, que contenía 12 nM de dominio extracelular de BACE1 humana, péptido de sitio activo de beta secretasa proteína precursora del amiloide 1 mM (FAM–KTEEISEVNLDAEFRWKK–$CONH_2$ (SEC ID NO: 55)), 50 mM de NaOAc pH 4.4 y 0,1% CHAPS. Se emplearon las mismas condiciones de reacción para el dominio extracelular de enzima BACE2 humana (5 nM) y el dominio extracelular de Catepsina D (6 nM, Calbiochem®). Luego de la incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, el producto y sustrato en cada reacción fueron separados utilizando un chip 12–sipper de microfluídica analizado en un LC3000® (ambos, Caliper Life Sciences). La separación del producto y el sustrato fue optimizada escogiendo voltajes y presión utilizando el programa informático de optimización del fabricante. El buffer de separación

contenía HEPES 100 mM pH 7.2, 0.015% Brij–35, 0,1% de reactivo de recubrimiento #3, EDTA 10 mM y 5% DMSO. Las condiciones de separación emplearon un voltaje corriente abajo de –500V, un voltaje corriente arriba de –2250V y una presión de screening de -8,16 kPa (–1,2 psi). Se excitó una fluorescencia del producto y sustrato a una longitud de onda de 488 nm y se detectó a una longitud de onda de 530 nm. Se calculó la conversión del sustrato del electroferograma utilizando un programa informático Analizador de Pocillos por HTS ("HTS Well Analyzer software") (Caliper Life Sciences).

Los resultados de los ensayos de HTRF y MCE, utilizando el anticuerpo YW412.8.31, se muestran en la Figura 9. La IC_{50} observada de este anticuerpo en el ensayo de péptido largo fue de 1.7 nM, alcanzando una inhibición máxima del 77%. Adicionalmente, el anticuerpo YW412.8.31 tenía una IC_{50} en el ensayo de péptido corto de 17 nM. Por añadidura, el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 inhibió la actividad de BACE1 con una IC_{50} de 80 pM en el ensayo de electroforesis capilar de microfluídica, y no inhibió BACE2 humana o catepsina D, una aspartil proteasa lisosómica. El análisis de SPR del anticuerpo YW412.8.31 también confirmó que el anticuerpo no se une a BACE2, la proteasa más altamente relacionada con BACE1. Estos datos en conjunto indican que el anticuerpo YW412.8.31 es un antagonista de BACE1 potente y selectivo. Se realizó una caracterización adicional de este anticuerpo para comprender mejor su función.

C. Ensayos de inhibición a base de células

Para determinar si la acción inhibidora in vitro observada de los anticuerpos anti–BACE1 sobre el procesamiento de APP también estaba presente en un contexto celular, se realizaron estudios *in vivo*. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos de inhibir la producción de $A\beta_{1-40}$ en células 293–HEK que expresan establemente proteína precursora del amiloide humana tipo salvaje de la siguiente manera. Se sembraron células $293–APP^{WT}$ durante toda la noche a una densidad de 3×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubó 50 µl de medio fresco (DMEM + 10% FBS) que contenía un anticuerpo anti–BACE1 o un anticuerpo IgG1 control con las células durante 24 horas a 37°C. También se empleó un inhibidor de BACE1 de pequeña molécula tricíclico (BACE1 SMI) como un control ((Compuesto 8e – Charrier, N. *et al. J. Med. Chem.* 51:3313–3317 (2008)). El medio celular se recolectó y evaluó para determinar la presencia de $A\beta_{1-40}$ utilizando un ensayo HTRF® de $A\beta_{1-40}$ (CisBio) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Los valores de $A\beta_{1-40}$ fueron normalizados para la viabilidad celular, según lo determinado utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter–Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Los experimentos se llevaron a cabo por lo menos tres veces, y cada punto en cada experimento fue repetido por duplicado. La información fue trazada utilizando un programa de ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software).

Se llevaron a cabo estudios similares en ganglios de raíces dorsales, neuronas corticales y neuronas de hipocampo aislados de ratones. Brevemente, se prepararon cultivos neuronales disociados de ganglios de raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) E13.5, neuronas corticales E16.5 y neuronas de hipocampo E16.5. Las neuronas fueron cultivadas durante cinco días *in vitro*. Se incubó medio nuevo que contenía anticuerpo anti-BACE YW412.8.31 o IgG1 control con las neuronas durante 24 horas. Se recolectó el medio y se evaluó para determinar la presencia de $A\beta_{40}$ utilizando el kit Ultrasensible a Aβ40 de Roedor / Humano (4G8) de MSD® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de $A\beta_{40}$ fueron normalizados para viabilidad celular, según lo determinado utilizando el Ensayo de Viabilidad Celular por Luminiscencia CellTiter–Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). El experimento se llevó a cabo por lo menos tres veces, y cada punto fue repetido por duplicado. Los datos fueron trazados empleando un programa de ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software).

Todos los anticuerpos anti–BACE1 analizados (LC6, LC9, YW412.8, YW412.8.30, YW412.8.31 y YW412.8.51) inhibieron la producción de $A\beta_{1-40}$ en células 293 que expresan APP en comparación con un inhibidor de anticuerpo IgG no BACE1 (Xolair®). Ver la Figura 10.

Como se muestra en la Figura 11, el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 inhibió la producción de $A\beta_{1-40}$ en células 293 que expresan APP hasta un grado similar al control de SMI de BACE1, con una IC_{50} de 17 nM y una reducción máxima de ~90%. Se obtuvo un resultado similar en neuronas de DRG, con una reducción de aproximadamente 50% en la producción de $A\beta_{40}$ a las concentraciones más altas de YW412.8.31, y una IC_{50} de 8.4 nM. El anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 también inhibió la producción de $A\beta_{40}$ en neuronas corticales y de hipocampo con una IC_{50} de 2.3–2.6 nM. Estos hallazgos indican que los anticuerpos anti–BACE1 funcionaron de manera similar en células a lo

observado previamente *in vitro*. Por añadidura, el anticuerpo YW412.8.31 parece mostrar la mejor potencia en neuronas del SNC.

D. Localización Intracelular de Anticuerpo Anti–BACE1

Se sabe que BACE1 es expresada intracelularmente, particularmente en el Golgi. Para determinar su YW412.8.31 interactúa o no con BACE1 en un medioambiente intracelular, se realizaron estudios de internalización. Se preparó un conjunto de cultivos neuronales de explantos de ganglios de raíz dorsal E13.5 (DRG), y se preparó un segundo conjunto de cultivos neuronales de neuronas corticales disociadas E16.5 de ratones BACE1 +/+ o BACE1 –/– y se cultivaron durante 24 o 72 horas, respectivamente, a 37ºC. Se agregó medio que contiene anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 0.5 µM a los cultivos durante períodos de tiempo que varían desde 30 minutos hasta 2 horas, y se incubó a 4ºC o 37ºC. El anticuerpo no unido se lavó vigorosamente con PBS después del tratamiento. Los cultivos se fijaron con 4% paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente, y las muestras seleccionadas también se permeabilizaron con 0,1% Triton X–100. Se detectó el anticuerpo unido utilizando un anticuerpo IgG1 anti-humano conjugado a Alexa 568 secundario (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La mayoría de la señal de anticuerpo se encontró que estaba internalizada en las muestras de temperatura elevada. Como puede verse en la Figura 12(B), BACE1 puede ser detectada intracelular ente en axones de DRG a 37°C cuando las células son permeabilizadas para permitir la detección de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 con el anticuerpo secundario. A la inversa, cuando DRGs son incubados en frío a 4°C para evitar la internalización, o cuando las células no son permeabilizadas para permitir la detección intracelular de YW412.8.31, se detecta muy poca BACE1 en la superficie celular. La internalización del anticuerpo en neuronas dependía de la unión de BACE1, porque era detectable solamente en neuronas corticales de animales BACE1 +/+, pero no en neuronas de animales BACE1–/–(comparar los paneles central y derecho de la Figura 12(C)).

Adicionalmente, las neuronas corticales de ratón fueron cultivadas en presencia de anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 o una IgG control durante 10 minutos o 3 horas, después de lo cual el anticuerpo fue detectado por inmunotinción. Los cultivos neuronales se prepararon a partir de neuronas corticales disociadas E15.5, y se cultivaron durante 14 DIV. Se agregó medio que contenía 1 □M de YW412.8.31 a cultivos durante 10 minutos a 3 horas, y se incubó a 37°C. El anticuerpo no unido se eliminó por lavado vigoroso con HBSS

después del tratamiento. Los cultivos se fijaron con 2% de paraformaldehído durante 10 minutos a Ta, y luego se permeabilizaron con 0,1% Triton X–100, o no. El anticuerpo unido se detectó utilizando un anticuerpo secundario de IgG1 anti-humana conjugado a Alexa 568 (Molecular Probes). Se analizó la localización de YW412.8.31 en células no permeabilizadas, para ver cuanto se había unido sobre la superficie de las células, así como también en células permeabilizadas para ver cuanto anticuerpo se había internalizado. La mayoría de la señal de anticuerpo detectada estaba localizada intracelularmente, observándose tinción de anticuerpo escasa sobre la superficie celular (Figura 12(A)). La internalización era evidente después de solo 10 minutos de tratamiento con YW412.8.31, lo cual sugiere que el anticuerpo es absorbido activamente por los endosomas tempranos. Gran parte de la señal de YW412.8.31 punteado lo cual indica que estaba contenido probablemente dentro de las vesículas.

Para identificar mejor los compartimientos subcelulares en los cuales se localizada YW412.8.31, hemos teñido en forma conjunta con marcadores de diferentes compartimientos vesiculares: endosomas tempranos (receptor de transferrina, TfR), red del trans–golgi (TGN) (VAMP4), y lisosoma (LAMP1). Las células fueron teñidas en forma conjunta con anti–TfR (Novus, Cat#NB100–64979), anti–VAMP4 (Novus, Cat#NB300–533) o anti–LAMP1 (BD Pharmingen, Cat#553792). La inmunorreactividad de YW412.8.31 fue co-localizada con marcadores para endosomas temprano y TGN, pero no lisosomas (Figura 12(A)). Este patrón es consistente con la localización de anticuerpos en compartimientos donde BACE1 es activa.

EJEMPLO 3: CARACTERIZACIÓN DE SITIO DE UNIÓN DE ANTICUERPOS ANTI–BACE1

Se llevaron a cabo estudios adicionales para identificar el sitio de unión de ciertos anticuerpos anti–BACE1 a BACE1 humana. En un conjunto de experimentos, se evaluó la unión de los anticuerpos a BACE1 (hBACE1) en presencia o ausencia de péptidos de unión a BACE1 de sitio activo o exositio conocidos para determinar que anticuerpos demostraban unión competitiva. En un segundo conjunto de experimentos, un Fab anti–BACE1 fue co-cristalizado con el dominio extracelular de BACE1 humana para determinar el sitio de unión tridimensional.

A. Unión Competitiva

Como un método indirecto para determinar el sitio de unión en BACE1 de los anticuerpos anti–BACE1 de la invención, se realizó un ELISA competitivo.

Brevemente, el anticuerpo YW412.8 IgG (1μg/ml) fue recubierto sobre inmunoplacas de 96 pocillos NUNC Maxisorp durante toda la noche a 4°C y se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora con buffer de bloqueo PBST (PBS y 1%BSA y 0.05% Tween 20). Se incubaron diluciones seriadas de anticuerpo anti–BACE1 YW412.8 o un péptido de unión a hBACE1 con una cantidad predeterminada de hBACE1 biotinilada y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego se agregaron las diluciones seriadas a una placa revestida con YW412.8 y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, las placas se lavaron con buffer de lavado (PBS con 0.05% T–20) y se desarrollaron mediante la adición de estreptavidina etiquetada con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las placas se lavaron y desarrollaron con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Se midió la unión de estreptavidina conjugada a HRP a hBACE1 biotinilada capturada a una longitud de onda de 630 nm utilizando técnicas convencionales.

Para determinar la concentración óptima de la proteína objetivo biotinilada empleada para el ensayo de ELISA de competición antes mencionado, se revistieron inmunoplacas Maxisorp de 96 pocillos NUNC y se bloquearon según lo descrito anteriormente. Se incubaron diluciones seriadas de objetivo biotinilado con placas revestidas con anticuerpo durante 30 min. a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron con PBST, seguido por incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección de la señal de unión era según lo descrito con anterioridad. Los datos fueron trazados utilizando un programa de ajuste de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software). La concentración de subsaturación de hBACE1 biotinilada se determinó del ajuste de curva y se aplicó al ELISA de competición antes mencionado.

Según lo esperado, YW412.8 compitió consigo mismo por la unión a hBACE1 (Figura 13). No se observó competición alguna entre YW412.8 y un péptido inhibidor de sitio activo OM99–2 (CalBiochem®, catálogo #496000). Se observó competición entre los anticuerpo anti-BACE1 LC6 y YW412.8 y un péptido de unión al exositio conocido, BMS1 (Péptido 1 de Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567–11572 (2005)). Combinados, estos resultados sugieren que YW412.8 se une a un exositio de BACE1 diferente del sitio activo de BACE1 para la disociación de APP. La forma de las curvas en la Figura 13 sugiere que YW412.8, LC6 y BMS1 pueden tener sitios de unión superpuestos en BACE1.

B. Estructura Cristalina

Para comprender mejor la interacción del anticuerpo YW412.8 con BACE1, el Fab YW412.8.31 fue cocristalizado con el dominio extracelular de dominio extracelular de BACE1 recombinante humana.

Expresión y Purificación Proteica

La expresión y purificación proteica de ADN de BACE1 (aminoácidos 57–453 de SEC ID NO: 49) con etiqueta His6 C terminal (SEC ID NO: 210) se sintetizó mediante Blue Heron, se clonó en el vector pET29a(+)(Novagen), y se transformó en células BL21(DE3) (Invitrogen). La expresión se llevó a cabo a 37°C durante 4 horas con inducción con β–D–1–tiogalactopiranósido de isopropilo (IPTG) 1mM . Las células se lisaron con microfluidificador y se aislaron cuerpos de inclusión (que contenían BACE1) y se lavaron dos veces con buffer TE (Tris 10 mM pH8.0 y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 1 mM). Se llevó a cabo la solubilización proteica utilizando urea 7.5 M, AMPSO 100 mM pH 10.8 y β–mercaptoetanol (BME) 100mM a temperatura ambiente durante 2 horas antes de la centrifugación a 12.000 rpm durante 30 min. Luego, el sobrenadante se diluyó con urea 7.5 M, AMPSO 100 mM pH 10.8 para lograr una DO_{280} de aproximadamente 1.5–2.0. Se realizó el replegamiento proteico diluyendo en primer lugar la BACE1 solubilizada 1:20 en agua fría, luego agitando suavemente la muestra a 4°C durante 3 semanas para permitir que se produzca el replegamiento. La purificación de BACE1 replegada involucró 3 pasos de cromatografía en columna. En primer lugar, BACE1 se cargó sobre una columna 50 ml Q sepharose Fast Flow (GE Healthcare) pre-equilibrada con Tris 20 mM pH 8.0 y urea 0.4 M, y se eluyó con un gradiente de sal de NaCl 0–0.5 M. Se agruparon fracciones pico, se diluyeron 5 veces con buffer Tris 20 mM pH 8.0, y se cargaron sobre una columna SourceTM15Q (GE Healthcare). Se empleó un gradiente de NaCl 0–0.3 M para eluir BACE1. Las fracciones que contenían proteína BACE1 se agruparon, concentraron y purificaron adicionalmente sobre una columna Superdex™ S75 (GE Healthcare) en Hepes 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM.

El Fab de YW412.8.31 fue expresado en *E. coli* y la pasta celular se descongeló en PBS, EDTA 25 mM y PMSF 1 mM. La mezcla se homogenizó, se pasó dos veces a través de un microfluidizador, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 60 min. Luego, el sobrenadante se cargó sobre una columna de Proteína G a 5 ml/min. La columna se lavó con PBS hasta línea basal y la proteína se eluyó con ácido acético al 0,58%. Las fracciones que contenían el Fab de

YW412.8.31 se agruparon y cargaron sobre una columna SP–sepharose equilibrada con MES 20 mM, pH 5,5, y el Fab eluyó con un gradiente de sal de NaCl 0 a 0.25 M. El Fab fue adicionalmente purificado sobre una columna Superdex™ S75 en Hepes 25 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM.

Cristalización

La proteína BACE1 purificada (aminoácidos 57 a 453 de SEC ID NO: 49) se mezcló con Fab de YW412.8.31 purificado a una relación molar 1:1,5 (exceso de Fab). El complejo se incubó durante 1 hora sobre hielo y se purificó sobre una columna de filtración en gel S200 26/60 (GE Healthcare) para separarlo del Fab en exceso. Luego, el complejo se concentró hasta 15 mg/ml. Se realizó la cristalización mediante el método de difusión de vapor por gota posada con 1µl de la solución del complejo BACE1/Fab mezclada con 1µl de solución en pocillo que contenía 20% PEG 4000, Tris 0.1M pH 8.5 y acetato sódico 0.2M. Luego, se incubaron las gotas de cristalización a 19°C. Aparecieron cristales después de 4 días y continuaron creciendo durante 2 días más. A continuación, los cristales fueron recolectados y sometidos a congelamiento flash en una solución crioprotectora que contenía licor madre y glicerol al 20%.

Recopilación de datos y determinación de estructura

Se recolectaron los datos de difracción utilizado un haz de rayos C monocromático (12658.4eV) en la línea de haz 7-1 de the Stanford Synchrotron Radiation Facility (SSRL). El dispositivo de detección por rayos X era un detector de CCD ADSC quantum–315 colocado 430 mm alejado del cristal. Se aplicó el método de rotación a un solo cristal para la recolección del conjunto de datos completo, con 0,5° de oscilación por marco y tamaño de cuña total de 180°. Luego, los datos fueron indexados, integrados y llevados a escala utilizando el programa HKL2000® (HLK Research, Inc.).

La estructura se resolvió utilizando el método de reemplazo molecular (RM) con el programa Phaser (Read, R.J., *Acta Cryst.* D57:1373–1382 (2000)). Los resultados del cálculo del coeficiente de Matthews indicaron que cada unidad asimétrica estaba compuesta por un complejo de BACE1/Fab y 48% de solvente. Por lo tanto, el cálculo de RM se dirigía a la búsqueda de un conjunto de tres subunidades que incluían los dominios N y C del Fab, y el dominio extracelular de BACE1. Los dominios de Fab de terminal N y C fueron sometidos a búsquedas por separado para posibilitar un ángulo de codo flexible. Los modelos de búsqueda de subunidades de Fab fueron derivados de la estructura cristalina del complejo

HGFA/Fab (código PDB: 2R0L, Wu, Y. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:19784–19789 (2007)). El modelo de búsqueda de BACE1 es del código de PDB de estructura de BACE1 publicado: 1FKN (Hong, L. *et al. Science* 290:150–153 (2000)). Los cambios conformacionales significativos se llevaron a cabo en la interface BACE1/Fab. La reconstrucción manual se realizó con el programa COOT (Crystallographic Object–Orientation Toolkit) (Emsley & Cowtan, *Acta. Cryst.* D60:2126–2132 (2004)). El refinamiento estructural se llevó a cabo iterativamente con el programa REFMAC5 (Murshudov, G.N., *et al.*, *Acta Cryst.* D53:240–255 (1997)) y PHENIX (Python–based Hierarchical Environment for Integrated Xtallography) (Adams, P.D. *et al. Acta. Cryst.* D66:213–221 (2010)) utilizando las funciones objetivo de máxima probabilidad, para lograr un factor R final de 0.221 y un R_{libre} de 0.274. Las estadísticas de refinamiento estructura son mostradas en la Tabla 5.

TABLA 5 – Estadísticas de Datos Cristalográficos

Recolección de datos	
Grupo espacial	$P2_1$
Unidad celular	a=46,1Å, b=75,5Å,c=112,0Å, a=90° b=99,8° g=90°
Resolución	30 – 2,8Å
Número total de reflexiones	64939
Compleción	97,9% (84,4%)[2]
Redundancia	3,5 (2,5)
I/σ	10,8(2,0)
Rsym[1]	0,112 (0,366)
Refinamiento	
Rango de resolución	30–2,8Å
Rcrist[3] / Rlibre[4]	0,221/0,274
Tamaño de conjunto de ensayo R libre	5% de reflexiones observadas
Átomos no hidrógeno	6324

Moléculas de agua	94
Promedio B, total	37,3
Proteína	37,6
Agua	29,7
longitudes de enlace r.m.s.d	0,003Å
ángulos r.m.s.d..	0,705°

[1]Rsim = $\Box|I_{hi} - I_h|/\Box I_{hi}$, donde I_{hi} es la intensidad llevada a escala de la *i-ésima* observación relacionada con la simetría de reflexión *h* y I_h es el valor medio.

[2]Los valores entre paréntesis son de la capa de mayor resolución la cual es (1.97 – 1.90Å).

[3]Rcrist = $\Box_h|F_{oh} - F_{ch}| /\Box_h F_{oh}$, donde F_{oh} y F_{ch} son las amplitudes del factor de estructura observadas y calculadas para reflexión *h*.

[4]El valor de Rlibre es calculado para 5% de reflexiones seleccionadas al azar no incluidas en el refinamiento.

El cristal difractado y la estructura fue refinada a una resolución de 2.8Å. La estructura total de la BACE1 en el complejo se asemeja en gran parte a su forma libre (Hong *et al.*, *Science* 290:150–153 (2000)) la cual puede ser alineada con 0.63Å RMSD en las posiciones atómicas Cα de 96% (373/385) de los residuos. El Fab de YW412.8.31 cubre un área superficial de ~840Å^2 en la superficie molecular de BACE1 y no se une en la proximidad del sitio activo. El epítopo comprende elementos estructurales denotados por Hong *et al.* (*Science* 290:150–153 (2000)) como lazo C (aminoácidos 315–318 de BACE1 de longitud completa), D (aminoácidos 331–335 de BACE1 de longitud completa), y F (aminoácidos 370–381 de BACE1 de longitud completa), los cuales están cercanamente ubicados en el espacio tridimensional. Adicionalmente, la parte de BACE1 en la proximidad del sitio de unión de YW412.8.31 adoptó un cambio conformacional, y dio como resultado un puntaje complementario de forma de 0.71, consistente con una unión fuerte. Se cree que el cambio conformacional inducido por el anticuerpo contribuye con la inhibición alostérica de la actividad de la secretasa.

El Fab unido a un exositio distal al sitio activo de BACE1 para proteína precursora del amiloide, parcialmente se superpone a un exositio previamente identificado como el sitio de unión para un panel de péptido de unión a BACE1

(Kornacker *et al.*, *Biochemistry* 44:11567–11572 (2005) (Figura 14). Tanto la cadena pesada como la cadena liviana están involucradas en la interacción (Figura 15). A diferencia de la forma libre, donde la región de epítopo de BACE1 es más dinámica según lo indicado por factores de temperatura elevada, la estructura unida al anticuerpo es estabilizada en una conformación única, la cual deforma los sitios P6 y P7 (Turner *et al.*, *Biochemistry* 44:105–112 (2005)) de la secretasa. En forma adyacente a esos sitios, los aminoácidos 218–231 (AGFPLNQSEVLASV (SEC ID NO: 126) de SEC ID NO: 49 (residuos 157–170 en Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1456–1460 (2000) (la numeración de aminoácidos comienza en el dominio de la proteasa madura de BACE1)), que adoptan una estructura de hélice α en el complejo unido al sustrato, se convierten en un lazo al azar en el complejo del anticuerpo, lo cual impacta adversamente sobre la disociación proteolítica de APP, quizás evitando que APP llegue a la hendidura catalítica de BACE1 en forma competente catalítica. El epítopo estructural incluye los residuos de aminoácidos de BACE1 que contienen uno o más átomos ubicados dentro de una distancia de 4 angstroms desde cualquier parte del Fab de YW412.8.31 en la estructura cristalina. Los residuos de cadena liviana de Fab pertenecen a la cadena L, y los residuos de cadena pesada de Fab pertenecen a la cadena H en la Tabla 6 que aparece a continuación. La numeración de residuos para aminoácidos de BACE1 se basa en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEC ID NO: 49). La numeración de residuos para los aminoácidos de Fab se basa en el esquema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

TABLA 6 – Residuos ubicados en la interface de unión YW412.8.31–BACE1

Residuos de BACE1	Residuos del Fab
314 SER	H 26 GLY
316 GLU	H 27 PHE
317 LYS	H 28 THR
318 PHE	H 30 LEU
319 PRO	H 31 GLY
327 GLN	H 32 TYR
328 LEU	H 53 ALA
329 VAL	H 58 ASP
330 CYS	H 94 ARG
331 TRP	H 96 PRO
332 GLN	H 97 PHE
333 ALA	H 98 SER
335 THR	H 99 PRO
337 PRO	H 100 TRP
340 ILE	
375 THR	L 49 TYR
378 ASP	L 53 PHE
380 CYS	L 55 TYR
426 PHE	L 56 SER
	L 94 TYR

Las interacciones atómicas detalladas están en la forma de contactos van der Waals de interacciones polares. Las interacciones polares incluyen enlaces de hidrógeno y puentes de sales. La Tabla 7 que aparece a continuación incluye una lista de las interacciones polares en pares entre BACE1 y el Fab de YW412.8.31. Los residuos de cadena liviana del Fab pertenecen a la cadena L, y los residuos de cadena pesada del Fab pertenecen a la cadena H. La numeración de residuos para aminoácidos de BACE1 se basa en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEC ID NO: 49). La numeración de residuos para los aminoácidos de Fab se basa en el esquema de numeración de Kabat.

TABLA 7 – Interacciones polares por pares entre BACE1 y el Fab de YW412.8.31

Residuos de BACE1—— Residuos del Fab
314 SER——H 98 SER
317 LYS——H 58 ASP
327 GLN——H 53 ALA
330 CYS——H 31 GLY
331 TRP——H 98 SER
331 TRP——H 32 TYR
332 GLN——H 32 TYR
378 ASP——H 32 TYR
316 GLU——L 94 TYR
332 GLN——L 55 TYR
335 THR——L 49 TYR

Como se muestra a continuación, la composición de aminoácidos en el epítopo de BACE1 del anticuerpo YW412.8.31 es pobremente conservada entre las regiones correspondientes en BACE2 y Catepsina D. Esta diferencia de aminoácidos en el epítopo para el anticuerpo YW412.8.31 es consistente con la observación de que el anticuerpo es altamente selectivo hacia BACE1. La numeración está basada en la secuencia de longitud completa de BACE1 (SEC ID NO: 49). Las secuencias de BACE2 y Catepsina D están alineadas a BACE1 en base a sus respectivas estructuras cristalinas. Los residuos en el epítopo de BACE1 de YW412.8.31 se encuentra encuadrados.

```
          251         261         271             311
BACE1 ••• ASSTEKFPDG FWLGEQLVCW QAGTTPWNIF ••• DVATSQDDCY  SEC ID NOS 123 & 130
BACE2 ••• ASLIPEFSDG FWTGSQLACW TNSETPWSYF ••• MGAGLNYECY  SEC ID NOS124 & 131
CatD  ••• ----VPLTQG EYM---IPCE KVST-----L ••• SQAG-KTLCL  SEC ID NOS125 & 132
```

EJEMPLO 4: CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* – RATONES

Se evaluó el efecto de YW412.8.31 *in vivo*. Para establecer la reducción máxima de A□$_{1-40}$ que un inhibidor específico de BACE1 pudiese lograr, se examinó la contribución de BACE1 a la producción de A□$_{1-40}$ en plasma y

prosencéfalo de ratones BACE1–/– en comparación con controles BACE1+/+. Se redujo la señal de A□$_{1–40}$ en plasma en 45%, y la señal en cerebro de A□$_{1–40}$ en 80% en ratones BACE1–/–(Figura 16, panel A). Estos resultados implican que BACE1 es de hecho la principal □–secretasa en el prosencéfalo, pero que en la periferia, BACE1 representa solamente una producción de A□$_{1–40}$ parcial, viniendo el resto de otra □–secretasa.

Con una comprensión de la contribución de BACE1 a la producción de Aβ, se evaluó la capacidad del anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 para modular el procesamiento amiloidogénico e ratones tipo salvaje y transgénicos con hAPP.

Ratones Transgénicos con hAPP

Resumidamente, se trataron ratones que expresan APP humana de 5 meses de edad con 30 mg/kg o 100 mg/kg de anticuerpo YW412.8.31 o vehículo mediante inyección intra–peritoneal cada cuatro días para un total de tres dosis (es decir en los días 1, 5, y 9). Los animales fueron sometidos a eutanasia dos horas después de la dosis final. Se recolectó y proceso suero, plasma y cerebros. El plasma, la corteza cerebral y el hipocampo se analizaron para determinar los niveles de A$\beta_{1–40}$ y A$\beta_{1–42}$ solubles utilizando un kit de ensayo de ELISA Amiloide beta (Aβ) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (The Genetics Company). El análisis farmacocinético se llevó a cabo en homogenados de suero y cerebro.

Los resultados mostraron que los niveles de A$\beta_{1–40}$ y A$\beta_{1–42}$ plasmáticos eran reducidos hasta aproximadamente 30% de los niveles de control en los niveles de 30 mg/kg y 100 mg/kg de dosis de anticuerpo YW412.8.31 (Figura 17(A), paneles superiores y Figura 18, panel A). Sin embargo, en contraste con lo observado en ratones tipo salvaje, descritos más adelante, los niveles de A$\beta_{1–40}$ y A$\beta_{1–42}$ en el cerebro fueron reducidos solamente e un 15–22% al nivel de dosis de 100 mg/kg del anticuerpo YW412.8.31 (Figura 17(A), paneles inferiores y Figura 18, panel A). La concentración de anticuerpo YW412.8.31 en el cerebro de animales tratados aumentó en forma dependiente de la dosis, con una concentración observada de anticuerpo en el cerebro en animales tratados con 30 mg/kg de 4.8 ± 3.6 nM y una concentración observada de anticuerpo en el cerebro en animales tratados con 100 mg/kg de 14.0 ± 9.3 nM, lo cual confirma que una dosis administrada intraperitonealmente superior de anticuerpo de hecho se tradujo en una dosis superior de anticuerpo observada en el cerebro. El trazado de

lecturas farmacocinéticas contra farmacodinámicas individuales sugirió que existe una relación PK/PD para este anticuerpo en este modelo (Figura 17(B)).

Se llevaron a cabo además experimentos similares en los cuales el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 fue administrado sistémicamente o directamente en cerebros de ratones transgénicos con hAPP mediante infusión ICV continua. Para la administración ICV, el anticuerpo se administró en forma continua durante 7 días por medio de una minibomba osmótica Alzet (modelo 2001) implantada unilateralmente. La cantidad de anticuerpo YW412.8.31 administrada fue de 0,041 mg/día (dosis baja) o 0,41 mg/día (dosis alta); 0,33 mg/día de IgG Control se administró al grupo control. En eutanasia, el plasma, la corteza cerebral y el hipocampo se recogieron y analizaron para determinar los niveles de $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ solubles mediante ELISA (The Genetics Company) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La Tabla 8 que aparece a continuación muestra las concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 en el cerebro de ratones dosificados con 30 mg/kg o 100 mg/kg mediante administración sistémica o 0,041 mg/día y 0,41 mg/día mediante administración ICV.

TABLA 8

	DOSIS	**CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN EL CEREBRO (µG/G)**	**CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN EL CEREBRO (NM)**
Administración Sistémica	30 mg/kg	0,7	4,8
	100 mg/kg	2,1	14
Administración ICV	Baja (0,041 mg/día)	13–25	87–167
	Elevada (0,41 mg/día)	110–305	733–2003

No obstante, a pesar de los niveles elevados de anticuerpo en el cerebro luego de la infusión, la reducción de Aβ era modesta a 15–23% y era similar a la reducción observada con la administración sistémica (Figura 18, panel B). Esta

observación sugiere que la inyección sistémica de dosis elevada puede ser capaz de reducir los niveles de Aβ en ratones transgénicos que expresan hAPP, sin embargo la reducción es modesta. La eficacia reducida en los ratones transgénicos que expresan hAPP se cree que es una consecuencia del modelo animal, puesto que las concentraciones elevadas en el cerebro, equivalentes a la concentración en suero luego de la administración sistémica, no redujeron adicionalmente la producción de A□. Por añadidura, la reducción en el cerebro en los ratones transgénicos que expresan hAPP es modesta en comparación con lo observado en ratones tipo salvaje y descritos a continuación. Por consiguiente, los ratones que expresan hAPP transgénicos pueden no ser ideales para estudiar los efectos anti–BACE1 *in vivo*. Los ratones tipo salvaje, son un modelo más apropiado para la eficacia del anticuerpo desde un punto de vista de la enfermedad también, ya que la gran mayoría de la población de pacientes con Alzheimer lleva un alelo de APP tipo salvaje.

Ratones Tipo Salvaje

También se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti–BACE1 YW412.8.31 de modular el procesamiento amiloidogénico en ratones tipo salvaje. Brevemente, se llevaron a cabo experimentos según lo descrito anteriormente. Se administró sistémicamente una dosis única de anticuerpo IgG control o anticuerpo YW412.8.31 (50 mg/kg) por inyección intravenosa (IV) a ratones tipo salvaje. Después de 24 o 48 horas, se recolectaron muestras de plasma y cerebro y se analizaron los niveles de $A\beta_{1-40}$. Se determinaron las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ de ratón total en plasma y cerebro utilizando un ELISA sándwich siguiendo procedimientos similares descritos más adelante para medir las concentraciones totales de anticuerpos anti–BACE1. Brevemente, anticuerpo policlonal de conejo específico para el término C de $A\beta_{1-40}$ (Millipore, Bedford, MA) se revistió sobre placas, y se empleó para la detección anticuerpo monoclonal Aβ antiratón biotinilado M3.2 (Covance, Dedham, MA). El ensayo tenía el límite inferior de los valores de cuantificación de 1,96 pg/ml en plasma y 39,1 pg/g en cerebro. Como se muestra en la Figura 16, panel B, se redujo el $A\beta_{1-40}$ plasmático en 35% y se redujo $A\beta_{1-40}$ cortical en 20%.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales con ratones C57Bl/6J del tipo salvaje en los cuales se administraron sistémicamente 100 mg/kg de YW412.8.31, o una IgG de control. Se determinaron los niveles de $A\square_{1-40}$ tanto en el plasma como en el prosencéfalo de animales tratados cuatro horas después de una única

inyección intraperitoneal (IP). Se extrajo sangre de animales mediante punción cardíaca para aislar el plasma. Luego de la perfusión PBS, se extrajo el cerebro y se preparó un prosencéfalo de un hemicerebro en buffer PK (1% NP–40 en PBS, con inhibidores de proteasa completa de Roche) mientras que el prosencéfalo del otro hemicerebro se homogenizó en GuHCL 5M, Tris 50mM pH 8.0, y se diluyó adicionalmente en Buffer de Bloqueo de Caseína (0,25% caseína/0,05% de azida sódica, 20μg/ml de aprotinina/ EDTA 5mM, pH 8.0/10□g/ml de leupeptina en PBS) para análisis de A□$_{1–40}$.

Como se muestra en la Figura 22, panel A, la dosis de 100 mg/kg fue capaz de reducir A□$_{1–40}$ en plasma en ~50% de los niveles controles y en forma similar a los niveles de desactivación de BACE1 descritos previamente. No obstante, no se detectó cambio alguno en A□$_{1–40}$ del prosencéfalo a 4 horas después de la administración. Este punto temporal temprano puede ser demasiado pronto después de la administración de YW412.8.31 para observar un efecto en el cerebro. Puede ser necesario una post administración de período de tiempo más largo para observar una reducción de Aβ en el cerebro, especialmente puesto que la reducción de Aβ es observada en ratones del tipo salvaje a una dosis inferior (50 mg/kg) a 24 horas, según lo descrito anteriormente. Las concentraciones de YW412.8.31 en suero eras muy elevadas, 1040 ± 140 □g/mL (6,9 ± 0,9 □M) mediante una post-administración de 4 horas. Las concentraciones de YW412.8.31 en el cerebro eran muy inferiores a 0,7 ± 0,4 □g/g (4,7 ± 2,7 nM), lo cual representó ~0,07% de concentración en suero, aproximándose cercanamente a la penetración en estado estable del 0,1% pronosticada de anticuerpos en el SNC (Reiber y Felgenhauer, *Clin. Chim. Acta.* 163:319–328 (1987). Importantemente, la concentración de anticuerpo lograda en el cerebro, 4,7 ± 2,7 nM, es cercana a la IC_{50} celular que fue previamente observada (Figura 11). Por consiguiente, el anticuerpo anti–BACE1 es altamente eficaz *in vivo*, según lo demostrado por la reducción de A□$_{1–40}$ en plasma hasta niveles vistos en ratones con desactivación ("knockout") de BACE1. Sin embargo, una única dosis sistémica no dio como resultado reducción en el cerebro a las 4 horas luego de la administración a los ratones, probablemente debido a que el punto en el tiempo era demasiado temprano para observar cualquier efecto.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales a fin de determinar el efecto de los niveles de anticuerpo en el cerebro elevados a través de dosis repetidas. Se administró anticuerpo YW412.8.31, o IgG control a 30 o 100 mg/kg IP cada 4

días durante un total de 3 dosis. En este estudio, se midieron los niveles de A□$_{1-40}$ tanto en el plasma como en el prosencéfalo de animales tratados 4 horas luego de la última dosis. Nuevamente, se observó una reducción de ~50% en los niveles de A□$_{1-40}$ en plasma luego de múltiples dosis a 30 y 100 mg/kg (Figura 22, panel B). Notablemente, se observó una reducción del 42% en A□$_{1-40}$ en prosencéfalo a la dosis elevada de anti–BACE1, si bien no se observó reducción alguna a la dosis baja. Las concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 en suero fueron 480 ± 210 y 1500 ± 440 □g/mL, y las concentraciones en el cerebro fueron 0,9 ± 0,6 □g/g (5,9 ± 4,3 nM) y 3,0 ± 1,6 □g/g (20 ± 10 nM) luego de la administración a 30 y 100 mg/kg dados cada 4 días, respectivamente. Por lo tanto, según lo pronosticado, los niveles más elevados de anticuerpo en el cerebro dieron como resultado reducciones fuertes en los niveles de A□. Notablemente, no había diferencia alguna en los niveles de A□□periféricos a la dosis de 30 mg/kg en comparación con la dosis de 100 mg/kg, lo cual sugiere que se logró una inhibición periférica máxima a 30 mg/kg y, por ende, la simple reducción de los niveles de A□□ periféricos no es suficiente para reducir los niveles cerebrales.

Adicionalmente, se obtuvieron los datos PK después de la dosificación con anticuerpo YW412.8.31 anti–BACE1 en ratones con desactivación de BACE1 y del tipo salvaje. Ver la Figura 19. Una única dosis de anti–BACE1 (1 o 10 mg/kg) fue administrada por medio de inyección IV a ratones BALB/C. Se analizó PK sérica a los 21 días luego de la dosis.

Se midieron las concentraciones de anticuerpo anti–BACE1 total en muestras séricas y cerebrales de ratón de la siguiente manera. Se midieron las concentraciones de anticuerpo en muestras de suero y cerebro de ratón utilizando un ensayo de inmunoabsorbencia vinculado con enzima (ELISA, por sus siglas en inglés). Se revistieron inmunoplacas Maxisorp de 384 pocillos NUNC (Neptune, NJ) con fragmento F(ab')$_2$ de IgG antihumana de burro, anticuerpo policlonal específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante toda la noche a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0.5% de seroalbúmina bovina (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente al día siguiente. Cada anticuerpo (IgG Control y anti–BACE1) se utilizó como un patrón para cuantificar las respectivas concentraciones de anticuerpo. Después de lavar las placas con PBS que contenía 0.05% Tween 20 utilizando un lavador de microplacas (Bio–Tek Instruments, Inc., Winooski, VT), los patrones y las muestras diluidas en PBS que contenían 0.5% BSA, NaCl 0.35 M, 0.25% CHAPS, EDTA 5 mM, 0.05% Tween 20

y 15 ppm de Proclin se incubaron sobre placas durante 2 horas a temperatura ambiente con leve agitación. El anticuerpo unido fue detectado con IgG anti-humana de cabra $F(ab')_2$ conjugado a peroxidasa de rábano picante, anticuerpo policlonal específico de Fc (Jackson ImmunoResearch). Finalmente, las placas fueron reveladas utilizando el sustrato 3,3',5,5'–tetrametil benzidina (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm con una referencia de 630 nm en un lector Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Las concentraciones se determinaron a partir de la curva estándar utilizando un programa de regresión no lineal de cuatro parámetros. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación (LLOQ) de 3,12 ng/ml en suero y 15.6 ng/g en cerebro.

Las concentraciones de anticuerpo YW412.8.31 libre en ratones fueron detectadas siguiendo procedimientos similares descritos con anterioridad utilizando ECD de BACE1 como recubrimiento y un anticuerpo específico de Fc, IgG antihumano (Jackson ImmunoResearch) para la detección. El ELISA de ratón anti–BACE1 libre tenía valores de LLOQ de 0,626 ng/ml en suero y 3,13 ng/g en cerebro.

Se utilizaron dos ensayos PK separados: un ensayo para detectar todo el YW412.8.31 en suero (mAb total), y un ensayo para detectar solamente YW412.8.31 no unido en suero (mAb libre). La cinética PK observada fue no lineal, y la diferencia en los valores de mAb totales versus libre para las muestras donde la concentración de YW412.8.31 es < 10 □g/mL sugiere una evacuación mediada por el objetivo ("target–mediated clearance"). Ver la Figura 19, panel A. Por añadidura, la diferencia entre mAb total y mAb no unido indica que algo del YW412.8.31 en suero estaba probablemente unido a BACE1 soluble. El análisis PK de única dosis en ratones BACE1+/+, BACE1+/–, y BACE1–/–confirma la no linealidad observada en el estudio inicial e indica que la mayor evacuación es de hecho mediada por el objetivo. Los ratones BACE1–/– muestran PK lineal. Ver la Figura 19 (Panel B).

EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN *IN VIVO*–MONO

Monos Cynomolgus fueron dosificados con IgG control o anticuerpo anti–BACE1 YW412.8.31 (30 mg/kg) mediante administración IV. Se sacaron muestras de plasma y CSF hasta 7 días antes de la dosificación para fijar niveles de $A\beta_{1-40}$ de punto de partida medios en cada animal individual, y luego en diversos momentos después de la dosificación. Se midieron las concentraciones de

anticuerpo control o anti–BACE1 totales en muestras de suero y CSF de mono utilizando anticuerpo policlonal de IgG anti-humana de cabra adsorbido por mono (Betil, Montgomery, TX) tanto como cubierta como detección (Figura 20). Se determinaron las concentraciones de anticuerpo anti–BACE1 libre en monos utilizando ECD de BACE1 como cubierta y anticuerpo IgG anti-humana de cabra adsorbido por mono (Betil) para la detección. Ambos ensayos de monos anti-BACE1 libre y total tuvieron un valor de LLOQ de 6,25 ng/ml en suero o CSF. PK es según lo esperado para IgG1 dosificada en mono y muestra una exposición pronosticada.

Se determinaron además los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma y CSF de monos Cynomolgus ensayados. Brevemente, se determinaron las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ cyno total en plasma utilizando MSD MA6000 Human (6E10) Abeta Kit (Cat#K111BVE–2, Meso Scale Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de captura, específico para el término C de $A\beta_{1-40}$, fue previamente recubierto sobre las placas, y se empleó para la detección anticuerpo monoclonal anti–Aβ Sulfo–Tag 6E10. El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación de 49,4 pg/ml en plasma. Las concentraciones de $A\beta_{1-40}$ cyno total en CSF fueron determinadas utilizando un ELISA tipo sándwich. Anticuerpo policlonal de conejo específico para el término C de $A\beta_{1-40}$ (cat#AB5737, Millipore, Bedford, MA) fue recubierto sobre placas, y se utilizó para la detección anticuerpo monoclonal anti– Aβ biotinilado 6E10 (Cat#SIG–39340, Covance, Dedham, MA). El ensayo tenía un límite inferior de valores de cuantificación de 15,6 pg/ml en CSF.

Como se muestra en la Figura 21 (Panel A), los niveles de $A\beta_{1-40}$ en plasma fueron reducidos ~50% del punto de partida a través de todos los individuos. Se mantuvieron reducciones en plasma máximas del 50% en Aβ a lo largo del período de observación de 7 días. El perfil de concentración sérica- tiempo para el anticuerpo anti-BACE1 YW412.8.31 pareció similar a aquel observado para el anticuerpo de IgG control, lo cual sugiere cinética similar a aquella de una IgG 1 típica dosificada en el rango lineal (Figura 20, panel A). Se observaron concentraciones de anticuerpo en suero pico de ~800 □g/mL en el momento de la primera extracción de muestra a los 15 minutos luego de la administración y cayeron hasta 232 □g/mL alrededor de los 7 días posteriores a la dosis. Notablemente, en todos los puntos en el tiempo medidos después de la

dosificación, las concentraciones en suero de YW412.8.31 excedieron la IC_{50} celular (~2,5nM, ver la Figura 11).

Los niveles de $A\beta_{1-40}$ en CSF, según lo mostrado en la Figura 21 (Panel B), si bien fueron variables, mostraron una reducción de hasta un 50% a 1 y 3 días luego de la dosificación seguido por una tendencia nuevamente hacia el Aβ del punto de partida al día 7 luego de la dosis. La variabilidad en los niveles en plasma y CSF del punto de partida se muestra en la Figura 21 (Paneles C y D). Los niveles en plasma del punto de partida eran bastante uniformes a través de los animales, mientras que los niveles de $A\beta_{1-40}$ en CSF eran altamente variables. Por lo tanto, todas las mediciones de $A\beta_{1-40}$ fueron normalizadas al punto de partida para cada mono individual.

Estos datos muestran que una sola dosis de YW412.8.31 en mono reduce significativamente los niveles de Aβ en plasma y CSF. En CSF, se observaron concentraciones de YW412.8.31 de 0,2–0,3 μg/ml en el transcurso de este período de tiempo, lo cual se traduce a ~2nM (Figura 20, panel B). A partir de estos datos, se infiere que las concentraciones en el cerebro de YW412.8.31 están en un rango similar. Comparando los datos PK y PD, estos resultados muestran que la exposición al fármaco en plasma es suficiente para inhibir máximamente la producción de Aβ en el lapso de una ventana de 7 días, mientras que concentraciones de fármaco se acerca a la IC_{50} celular y reducen los niveles de Aβ en el cerebro transitoriamente al nivel de dosis ensayado (30 mg/kg). En síntesis, estos datos proporcionan una fuerte evidencia en cuanto a que anti-BACE1 administrada sistémicamente puede reducir la actividad de BACE1 en el cerebro, según lo determinado por mediciones de Aβ en CSF, en un primate no humano.

EJEMPLO 6: MADURACIÓN POR AFINIDAD DEL ANTICUERPO YW412.8.31

El anticuerpo YW412.8.31 fue madurado por afinidad guiados por los datos estructurales proporcionados por la estructura cristalina previamente descrita. Los residuos de anticuerpo en contacto con BACE1 fueron mutados a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo YW412.8.31. Los clones madurados por afinidad producidos mediante esta estrategia tienen la nomenclatura YW412.8.31xS. Los clones madurados por afinidad de YW412.8.31 también fueron producidos mediante targeting por aleatorización blanda de todas las CDRs, según lo descrito previamente, y tienen la nomenclatura YW412.8.31x. Las secuencias variables de

cadena pesada y las secuencias variables de cadena liviana para clones que se unen BACE1 se ilustran en las Figuras 23 (A) – (C) y 24 (A) – (C).

Los clones que se unieron a BACE1 fueron analizados para determinar la inhibición de la proteasa de BACE1 en un ensayo de HTRF basado en células según lo descrito previamente en el Ejemplo 2C. Los resultados del ensayo son ilustrados en las Figuras 25A y 25B. La Figura 25B muestra los resultados de la producción de $A\beta_{1-40}$ (pg/ml) a partir de neuronas corticales primarias tratadas durante 24 horas con diversos anticuerpos anti-BACE1 madurados por afinidad en las concentraciones indicadas. Varios de los anticuerpos analizados inhibieron BACE1 a un nivel similar a aquel observado con YW412.8.31.

Si bien la invención que antecede ha sido descrita con ciertos detalles a modo de ilustración y en forma ejemplificativa por cuestiones de claridad de entendimiento, las descripciones y los ejemplos no deben ser interpretados como una limitación al alcance de la invención. Las descripciones de la bibliografía técnica científica y de patentes citadas en la presente son expresamente incorporadas en su totalidad a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o su fragmento, que se une a BACE1, donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad del polipéptido BACE1.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une al sitio activo de BACE1.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une a un exositio de BACE1.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia de región hipervariable (HVR) seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 7–19, 22–26, 28–30, 35–47, 56–79 y 118–122.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GFX_{30}FX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}IH$ (SEC ID NO: 45), donde X_{30}=N o T; X_{31}=S, L o Y; X_{32}=G o Y; X_{33}=Y o S; y X_{34}=A, G o S; HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{35}X_{36}ISPX_{37}X_{38}GX_{39}TX_{40}YADSVKG$ (SEC ID NO: 46), donde X_{35}=A o G; X_{36}=W o S; X_{37}=A o Y; X_{38}=G o S; X_{39}=S o Y; y X_{40}=D o S; y HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{41}PX_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}X_{47}MDY$ (SEC ID NO: 47), donde X_{41}=Q o G; X_{42}=T o F; X_{43}=H o S; X_{44}=Y o P; X_{45}=Y o W; X_{46}=Y o V y donde X_{47} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48).

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{71}X_{72}X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}IH$ (SEC ID NO: 120), donde X_{71}=F o Y; X_{72}=F, N o T; X_{73}=F o Y; X_{74}=L, Q, I, S o Y; X_{75}=G o Y; X_{76}=Y o S; y X_{77}=A, G o S; HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{78}X_{79}ISPX_{80}X_{81}GX_{82}X_{83}X_{84}YADSVKG$ (SEC ID NO: 121), donde X_{78}=A o G; X_{79}=W o S; X_{80}=A, S, Q o Y; X_{81}=G o S; X_{82}=S, K, L o Y; X_{83}=T o Y; y X_{84}=D o S; y HVR–H3 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{85}PX_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}MDY$ (SEC ID NO: 122), donde X_{85}=Q o G; X_{86}=T o F; X_{87}=H, Y o S; X_{88}=Y o P; X_{89}=Y o W; X_{90}=Y o V y donde X_{91} opcionalmente incluye la secuencia YAKGYKA (SEC ID NO: 48).

7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–H1, HVR–H2 y HVR–H3, donde HVR–H1 comprende la secuencia de aminoácidos $GX_{53}X_{54}X_{55}X_{56}GYGIH$ (SEC ID NO: 68), donde X_{53}=F o Y; X_{54}=T o F; X_{55}=F o Y;

X_{56}=L, Q o I, HVR–H2 comprende la secuencia de aminoácidos GWISP$X_{57}X_{58}GX_{59}X_{60}$DYADSVKG (SEC ID NO: 69), donde X_{57}=A, S o Q; X_{58}=G o S; X_{59}=S, K o L; X_{60}=T o Y, donde la secuencia HVR–H3 que comprende la secuencia de aminoácidos GPFX_{61}PWVMDY (SEC ID NO: 70), donde X_{61}=S o Y o una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 79.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una secuencia de HVR–H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GFTFX_{13}GYX_{14}IH (SEC ID NO: 26), donde X_{13}=S o L y X_{14}=A o G.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia HVR–H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 22; SEC ID NO: 23; SEC ID NO: 28 y SEC ID NOs: 71–73.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia HVR–H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 24, SEC ID NO: 29 y SEC ID NOs: 74–78.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia HVR–H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID NO: 25; SEC ID NO: 30 y SEC ID NO: 79.

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las secuencias HVR–H1, HVR–H2, y HVR–H3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(B) o clones en las Figuras 24(A)–(C).

13. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende las secuencias HVR–H1, HVR–H2, y HVR–H3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones Fab12, LC6, LC9 y LC10 en la Figura 2(B).

14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia HVR–H1 de SEC ID NO: 22 o 23, una secuencia HVR–H2 de SEC ID NO: 24 y una secuencia HVR–H3 de SEC ID NO: 25.

15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, donde la secuencia HVR–H1 es SEC ID NO: 23.

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una secuencia HVR–H1 de SEC ID NO: 28, una secuencia HVR–H2 de SEC ID NO: 29, y una secuencia HVR–H3 de SEC ID NO: 30.

17. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende una cadena VH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 20, 21, 27 y 80–98.

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16, donde la secuencia de aminoácidos de cadena VH es SEC ID NO: 21.

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3 donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEC ID NO: 42), donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{22}ASX_{23}LYS$ (SEC ID NO: 43), donde X_{22}=S, W, Y o L; X_{23}=F, S o W, y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}T$ (SEC ID NO: 44), donde X_{24}=S, F, G, D o Y; X_{25}=Y, P, S o A; X_{26}=Y, T o N; X_{27}=T, Y, D o S; X_{28}=P o L; y X_{29}=F, P o T.

20. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo de HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3 donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_{17}VX_{18}X_{19}X_{20}X_{21}A$ (SEC ID NO: 42), donde X_{17}=S, D o V; X_{18}=S o A; X_{19}=S, T o N; X_{20}=A o S; X_{21}=V o L, HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{62}ASX_{63}X_{64}YX_{65}$ (SEC ID NO: 118), donde X_{62}=S, W, Y, F o L; X_{63}=F, S, Y o W; X_{64}=L o R; X_{65}=S, P, R, K o W, y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}T$ (SEC ID NO: 119), donde X_{66}=S, F, G, D o Y; X_{67}=Y, P, S o A; X_{68}=Y, T o N; X_{69}=T, Y, D o S; X_{70}=P, Q, S, K o L; y X_{71}=F, P o T.

21. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3, donde HVR–L1 comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A; X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L, HVR–L2 comprende la secuencia de aminoácidos $X_{48}ASX_{49}X_{50}YX_{51}$ (SEC ID NO: 56), donde X_{48}=S o F; X_{49}=F o Y; X_{50}=L o R; X_{51}=S, P, R, K o W y HVR–L3 comprende la secuencia de aminoácidos $QQFPTYX_{52}PT$ (SEC ID NO: 57), donde X_{52}=L, Q, S o K.

22. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende una secuencia HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos $RASQX_1VX_2X_3X_4X_5A$ (SEC ID NO: 17), donde X_1=D o V; X_2=S o A; X_3=T o N; X_4=S o A; X_5=V o L.

23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una secuencia HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos $X_6ASFLYS$ (SEC ID NO: 18) o $X_{15}ASX_{16}LYS$ (SEC ID NO: 41), donde X_6=S o L; X_{15}=S, W o Y; y X_{16}=S o W.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una secuencia HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos $QQX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}T$ (SEC ID NO: 19), donde X_7=S, F, G, D o Y; X_8=Y, P, S, o A; X_9=T o N; X_{10}=T, Y, D o S; X_{11}=P o L; X_{12}=P o T.

25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende una secuencia HVR–L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8 o SEC ID NO: 35.

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia HVR–L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NOs: 36–39 y SEC ID NOs: 58–64.

27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia HVR–L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 11–16, SEC ID NO: 40 y SEC ID NOs: 65–67.

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende las secuencias HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones YW412.8, YW412.8.31, YW412.8.30, YW412.8.2, YW412.8.29 y YW412.8.51 en la Figura 1(A) y clones en las Figuras 23(A)–(C).

29. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende las secuencias HVR–L1, HVR–L2 y HVR–L3 correspondientes a aquellas expuestas para los clones Fab12, LC6, LC9 y LC10 en la Figura 2(A).

30. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia HVR–L1 de SEC ID NO: 7 o SEC ID NO: 8; una secuencia HVR–L2 de SEC ID NO: 9 o SEC ID NO: 10; y una secuencia HVR–L3 seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NOs: 11–16.

31. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 30, donde la secuencia HVR–L1 es SEC ID NO: 7, la secuencia HVR–L2 es SEC ID NO: 9 y la secuencia HVR–L3 es SEC ID NO: 12.

32. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia HVR–L1 de SEC ID NO: 35; una secuencia HVR–L2 seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 36–39 y una secuencia HVR–L3 de SEC ID NO: 40.

33. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 20, que comprende una secuencia de cadena VL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NOs: 1–6, 31–34 y 99–117.

34. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33, donde la secuencia de aminoácidos de cadena VL es SEC ID NO: 2.

35. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende además una HVR–L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7, una HVR–L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 y una HVR–L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 12.

36. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende además una cadena VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 21.

37. Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, el cual se une a un epítopo que comprende por lo menos uno de los residuos de aminoácidos de BACE1 seleccionado del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

38. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 37, donde el epítopo comprende 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

39. Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, el cual se une a un epítopo que comprende por lo menos una región aminoácida de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 315–318 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 331–335 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 370–381 de SEC ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos.

40. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 39, donde el epítopo comprende los aminoácidos 315–318, 331–335 y 370–381 de SEC ID NO: 49.

41. Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, el cual se une a un epítopo de BACE1 y da como resultado un cambio conformacional en la estructura de los sitios P6 y P7 de BACE1 luego de la unión.

42. Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, el cual se une a un epítopo de BACE1 e induce a que los aminoácidos 218–231 de SEC ID NO: 49 adopten una estructura de lazo al azar luego de la unión.

43. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicaciones 37–42, donde el anticuerpo reduce o inhibe la actividad de BACE1.

44. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–43, el cual es un anticuerpo monoclonal.

45. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–44, el cual es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

46. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–45, el cual es un fragmento de anticuerpo.

47. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–45, el cual es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

48. Acido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47.

49. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 48.

50. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 49 de modo que se produzca el anticuerpo.

51. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 y un agente citotóxico.

52. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 y un portador farmacéuticamente aceptable.

53. Un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47.

54. Un método para reducir placas amiloideas en un paciente que sufre de, o que corre el riesgo de contraer, una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47.

55. Un método para inhibir la formación de placas amiloideas en un paciente que sufre de, o que corre el riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47.

56. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 53–55, donde la enfermedad o trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (EA), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, glaucoma, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Paget, lesión cerebral traumática, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear, encefalopatía espongiforme

bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, insomnio fatal familiar, parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cereoidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden–Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch–Nyhan, y síndrome de Unverricht–Lundborg, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelosa.

57. El método de acuerdo con la reivindicación 56, donde la enfermedad o trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática y glaucoma.

58. Un método para reducir la proteína amiloide–□□□(A□) en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47.

59. El método de acuerdo con la reivindicación 58, donde el paciente está sufriendo de, o corre riesgo de contraer, una enfermedad o trastorno neurológico.

60. El método de acuerdo con la reivindicación 59, donde la enfermedad o trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática y glaucoma.

61. Un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno neurológico en un paciente que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 bajo condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un polipéptido de BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido de BACE1.

62. Un método para determinar si un paciente es elegible para terapia con un anticuerpo anti–BACE1, que comprende poner en contacto una muestra biológica aislada del paciente con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 bajo condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo a un polipéptido de BACE1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido de BACE1, donde la presencia de un complejo entre el anticuerpo y BACE1 es indicativa de un paciente que puede ser elegido para terapia con un anticuerpo anti–BACE1.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 61 o 62, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma, saliva,

secreciones gástricas, moco, fluido cerebroespinal, fluido linfático, tejido neuronal, tejido cerebral, tejido cardíaco o tejido vascular.

64. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 para utilizar como un medicamento.

65. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 para utilizar en el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (AD), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, glaucoma, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Paget, lesión cerebral traumática, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear, encefalopatía espongiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, insomnio fatal familiar, parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cereoidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden–Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch–Nyhan, y síndrome de Unverricht–Lundborg, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelosa.

66. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 para utilizar en la disminución y/o inhibición de la producción de la proteína amiloide–□□(A□).

67. El uso del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1–47 en la manufactura de un medicamento.

68. El uso de acuerdo con la reivindicación 67, donde el medicamento es para el tratamiento de un trastorno neurológico seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (AD), lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Paget, lesión cerebral traumática, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome pospoliomielitis, síndrome de Shy–Draeger, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear, encefalopatía espongiforme

bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt–Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann–Straussler–Scheinker, enfermedad debilitante crónica, insomnio fatal familiar, parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis cereoidea neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden–Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch–Nyhan, y síndrome de Unverricht–Lundborg, enfermedad de Pick, y ataxia espinocerebelosa.

69. El uso de acuerdo con la reivindicación 67, donde el medicamento es para reducir y/o inhibir la producción de la proteína amiloide–□ (A□).

70. Un epítopo de BACE1 el cual es específicamente reconocido por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende por lo menos uno de los residuos aminoácidos de BACE1 los cuales corresponden a los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

71. El epítopo de BACE1 de acuerdo con la reivindicación 70, donde el epítopo comprende aminoácidos los cuales corresponden a 314 SER; 316 GLU; 317 LYS; 327 GLN; 330 CYS; 331 TRP; 332 GLN; 335 THR; y 378 ASP de SEC ID NO: 49.

72. Un epítopo de BACE1 el cual es específicamente reconocido por un anticuerpo, o fragmento del mismo, que comprende por lo menos una región aminoácida de BACE1 seleccionada del grupo que consiste en: aminoácidos 315–318 de SEC ID NO: 49; aminoácidos 331–335 de SEC ID NO: 40; aminoácidos 370–381 de SEC ID NO: 49; y cualquier combinación de los mismos.

73. El epítopo de BACE1 de acuerdo con la reivindicación 72, donde el epítopo comprende los aminoácidos 315–318, 331–335 y 370–381 de SEC ID NO: 49.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La invención proporciona anticuerpos contra proteínas neurales específicas y método para su utilización.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA DE ENFERMEDAD NEURAL

<130> P4453R1

<140>
<141>

<150> 61/426.425
<151> 22-12-2010

<150> 61/418.850
<151> 01-12-2010

<150> 61/418.310
<151> 30-11-2010

<150> 61/456.642
<151> 10-11-2010

<160> 210

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10							15

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20				25					30			

Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipépido Sintético"

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
Sintético"

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 108
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 8
Arg Ala Ser Gln Val Val Ala Asn Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético "

<400> 9
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 10
Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 11
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 12
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 13
Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 14
Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr Thr
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 15
Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 16
Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso Sintética"

<220>
<221> VARIANTEE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Val"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTEE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)

<223> /reemplazar="Asn"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(10)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 17
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ser Val Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 18
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 19
<211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Pro" o "Ser" o "Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Asn"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Asp" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Thr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 19
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 20
<211> 119
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 22
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 23
Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 24
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 25

Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 26
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 27
<211> 129
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 27
Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
20 25 30

Tyr Tyr Ser Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly
100 105 110

Tyr Lys Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 28
Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29
Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro
Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
Sintético"

<400> 33
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro
Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
Sintético"

<400> 34
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 35
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 36
Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 37
Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 38
Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 39
Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 40
Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 41

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Trp" o "Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Trp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 41
Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso Sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Asp" o "Val"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Thr" o "Asn"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(10)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 42
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)

<223> /reemplazar="Trp" o "Tyr" o "Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Ser" o "Trp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 43
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Pro" o "Ser" o "Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Thr" o "Asn"

<220>
<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Asp" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Leu"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Pro" o "Thr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 44
Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Thr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Leu" o "Tyr"

<220>

<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Gly" o "Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 45
Gly Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 46
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 46
Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 47
<211> 17
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Pro"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Trp"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Val"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(14)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(14)

<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(14)
<223> /nota="Cuando está presente, esta región está presente en su totalidad"

<400> 47
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 48
Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
1 5

<210> 49
<211> 501
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45

```
Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met
Val
    50                  55                  60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met
Thr
65                  70                  75
80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly
Ser
                85                  90                  95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg
Tyr
            100                 105                 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly
Val
        115                 120                 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr
Asp
    130                 135                 140

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn
Ile
145                 150                 155
160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn
Trp
                165                 170                 175

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp
Asp
            180                 185                 190

Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val
Pro
        195                 200                 205
```

Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn
Gln
210 215 220

Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly
Ile
225 230 235
240

Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg
Arg
245 250 255

Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly
Gln
260 265 270

Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile
Val
275 280 285

Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu
Ala
290 295 300

Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro
Asp
305 310 315
320

Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr
Thr
325 330 335

Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu
Val
340 345 350

Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu
Arg
355 360 365

Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe
Ala
370 375 380

Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met
Glu
385 390 395
400

Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe
Ala
405 410 415

Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val
Glu
420 425 430

Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile
Pro
435 440 445

Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala
Ala
450 455 460

Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln
Trp
465 470 475
480

Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp
Asp
485 490 495

Ile Ser Leu Leu Lys
500

<210> 50
<211> 476
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly
Val

1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
20 25 30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
35 40 45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
50 55 60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
65 70 75 80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
85 90 95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
100 105 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
130 135 140

Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
165 170 175

Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Leu Cys
Gly
180 185 190

Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly
Gly
195 200 205

Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser
Leu
210 215 220

Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile
Val
225 230 235
240

Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu
Tyr
245 250 255

Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg
Leu
260 265 270

Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala
Ser
275 280 285

Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu
Val
290 295 300

Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile
Ser
305 310 315
320

Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr
Ile
325 330 335

```
Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser
Gln
          340                 345                 350

Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr
Val
      355                 360                 365

Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg
Ala
     370                 375                 380

Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp
Glu
385                 390                 395
400

Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met
Glu
            405                 410                 415

Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met
Thr
          420                 425                 430

Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro
Leu
       435                 440                 445

Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln
Gln
     450                 455                 460

His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
465                 470                 475


<210> 51
<211> 457
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly
Val
1               5                  10                  15
```

```
Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg
Ser
            20                  25                  30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr
Asp
        35                  40                  45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met
Val
    50                  55                  60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met
Thr
65                  70                  75
80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly
Ser
                85                  90                  95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg
Tyr
            100                 105                 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly
Val
        115                 120                 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr
Asp
    130                 135                 140

Leu Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys
Gln
145                 150                 155
160

Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly
Phe
                165                 170                 175
```

Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met
Ile
180 185 190

Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr
Thr
195 200 205

Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val
Glu
210 215 220

Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr
Asp
225 230 235
240

Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys
Lys
245 250 255

Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr
Glu
260 265 270

Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp
Gln
275 280 285

Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr
Leu
290 295 300

Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro
Gln
305 310 315
320

Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp
Cys
325 330 335

Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala
340 345 350

Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg
355 360 365

Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr
370 375 380

Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly
385 390 395 400

Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr
405 410 415

Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met
420 425 430

Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp
435 440 445

Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
450 455

<210> 52
<211> 432
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
1 5 10 15

Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser

```
                20                  25                  30

Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr
Asp
        35                  40                  45

Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met
Val
    50                  55                  60

Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met
Thr
65                  70                  75
80

Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly
Ser
                85                  90                  95

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg
Tyr
            100                 105                 110

Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly
Val
        115                 120                 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr
Asp
    130                 135                 140

Leu Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu
Ala
145                 150                 155
160

Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu
Tyr
                165                 170                 175

Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr
Glu
            180                 185                 190
```

```
Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met
Asp
        195                 200                 205

Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr
Thr
    210                 215                 220

Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser
Ile
225                 230                 235
240

Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu
Gly
            245                 250                 255

Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile
Phe
            260                 265                 270

Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser
Phe
        275                 280                 285

Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp
Val
    290                 295                 300

Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser
Ser
305                 310                 315
320

Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val
Val
            325                 330                 335

Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys
His
            340                 345                 350
```

Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val
Thr
355 360 365

Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu
Ser
370 375 380

Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu
Phe
385 390 395
400

Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Cys Cys Leu Arg
Cys
405 410 415

Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu
Lys
420 425 430

<210> 53
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="biotina de terminal N"

<400> 53
Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg
His
1 5 10 15

Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
20 25

<210> 54
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Rh de term N"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="templador de terminal C"

<400> 54
Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Lys
1 5

<210> 55
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> fuente
<223> /nota="FAM de terminal N"

<220>
<221> fuente
<223> /nota=" CONH2 de terminal C"

<400> 55

Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg Trp
1 5 10 15

Lys Lys

<210> 56
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Arg"

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Pro" o "Arg" o "Lys" o "Trp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 56
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Gln" o "Ser" o "Lys"

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 57
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro Thr
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 58
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 59
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 60
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 61
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 62
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 63
Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 64
Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 65
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln Pro Thr
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 66
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro Thr
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 67
Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro Thr
1 5

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Gln" o "Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(5)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 68
Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 69
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ser" o "Gln"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Lys" o "Leu"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 69
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 70
Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 71
Gly Phe Phe Phe Gln Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 72
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 73
Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 74
Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 75
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 75
Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 76
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 77
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 77
Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 78

<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 78
Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 79
Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 80
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 81
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Gln Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 83
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Gln Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 84
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 85
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 86
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr

65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 87
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 88
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 89
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 91
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 92
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Lys Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 93
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 94
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 119

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 95
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Leu Tyr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Tyr Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 96
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ile Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 97
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptid sintético"

<400> 98
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Gly
Tyr
20 25 30

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 99
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 100
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 100
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 101
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 101
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 102
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 102
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 103
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 103
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 104
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 105
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 106
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 107
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 107
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 109
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 109
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Gln
Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 110
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 110
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 111

<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 111
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 112
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 112
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 113
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 113
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Trp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Lys
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 114
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 114
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 115
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 115
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 116
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético"

<400> 116
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr
Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu
Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 117
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 117
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Phe Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75
80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 118

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Trp" o "Tyr" o "Phe" o "Leu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Ser" o "Tyr" o "Trp"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Arg"

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(5)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Pro" o "Arg" o "Lys" o "Trp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<400> 118
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Phe" o "Gly" o "Asp" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Pro" o "Ser" o "Ala"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Thr" o "Asn"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Asp" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Gln" o "Ser" o "Lys" o "Leu"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Pro" o "Thr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 119
Gln Gln Ser Tyr Tyr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /reemplazar="Asn" o "Thr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Gln" o "Ile" o "Ser" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(8)
<223> /reemplazar="Gly" o "Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(8)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 120
Gly Phe Phe Phe Leu Gly Tyr Ala Ile His
1 5 10

<210> 121
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Ser" o "Gln" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /reemplazar="Lys" o "Leu" o "Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (10)..(10)
<223> /reemplazar="Tyr"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (11)..(11)
<223> /reemplazar="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(11)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 121
Ala Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de consenso sintética"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)..(1)
<223> /reemplazar="Gly"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /nota="El residuo dado en la secuencia no tiene preferencia alguna
con respecto a las anotaciones para dicha posición"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)

<223> /reemplazar="Phe"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /reemplazar="Tyr" o "Ser"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (5)..(5)
<223> /reemplazar="Pro"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /reemplazar="Trp"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (7)..(7)
<223> /reemplazar="Val"

<220>
<221> VARIANTE
<222> (8)..(14)
<223> /reemplazar=" "

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(14)
<223> /nota="Los residuos dados en la secuencia no tienen preferencia alguna con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(14)
<223> /nota="Cuando está presente, esta región está presente en su totalidad"

<400> 122
Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala Met Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 123
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123
Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu
Gln
1 5 10 15

Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe
20 25 30

<210> 124
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124
Ala Ser Leu Ile Pro Glu Phe Ser Asp Gly Phe Trp Thr Gly Ser
Gln
1 5 10 15

Leu Ala Cys Trp Thr Asn Ser Glu Thr Pro Trp Ser Tyr Phe
20 25 30

<210> 125
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125
Val Pro Leu Thr Gln Gly Glu Tyr Met Ile Pro Cys Glu Lys Val
Ser
1 5 10 15

Thr Leu

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 126
Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val
1 5 10

<210> 127
<211> 4
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 127
Glu Lys Phe Pro
1

<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 128
Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala
1 5

<210> 129
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 129
Pro Phe Ser Pro Trp
1 5

<210> 130
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 130
Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr
1 5 10

<210> 131
<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 131
Met Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Glu Cys Tyr
1 5 10

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 132
Ser Gln Ala Gly Lys Thr Leu Cys Leu
1 5

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 133
Ser Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 134
Tyr Ser Ala Ser Ser
1 5

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 135
Tyr Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Val
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 136
Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
1 5

<210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 137
Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ile
1 5

<210> 138
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 138
Ser Ser Ser Ser Leu Phe
1 5

<210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 139
Tyr Tyr Tyr Ser Leu Phe
1 5

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 140
Ser Tyr Tyr Ser Tyr Ser Leu Val
1 5

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 141
Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Pro Ile
1 5

<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 142
Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Pro Leu
1 5

<210> 143
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 143
Ser Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Ile
1 5

<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 144
Tyr Tyr Ser Ser Ser Leu Val
1 5

<210> 145
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 145
Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
1 5

<210> 146
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 146
Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Pro Ile
1 5

<210> 147
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 147
Tyr Ser Tyr Tyr Ser Leu Phe
1 5

<210> 148
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 148
Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val
1 5

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 149
Ser Tyr Tyr Tyr Ser Pro Phe

1 5

<210> 150
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 150
Ser Tyr Ser Tyr Pro Val
1 5

<210> 151
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 151
Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu
1 5

<210> 152
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 152
Ser Tyr Tyr Tyr Pro Leu
1 5

<210> 153
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 153
Phe Tyr Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 154
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 154
Ile Tyr Tyr Ser Ser Met
1 5

<210> 155
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 155
Phe Tyr Tyr Tyr Ser Met
1 5

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 156
Ile Tyr Ser Tyr Ser Met
1 5

<210> 157
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 157
Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile
1 5

<210> 158
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 158
Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile
1 5

<210> 159
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 159
Phe Ser Ser Tyr Tyr Ile
1 5

<210> 160
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 160
Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile
1 5

<210> 161
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 161
Val Ser Ser Ser Tyr Met
1 5

<210> 162
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 162
Val Ser Ser Ser Ser Met
1 5

<210> 163
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 163
Phe Tyr Tyr Ser Tyr Met
1 5

<210> 164
<211> 6
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 164
Phe Tyr Ser Tyr Ser Met
1 5

<210> 165
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 165
Leu Tyr Tyr Ser Ser Ile
1 5

<210> 166
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 166
Val Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 167
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 167
Val Tyr Tyr Ser Tyr Met

1 5

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 168
Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 169
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 169
Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 170
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 170
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 171
Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 172
Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 173
Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 174
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 174
Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 175
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 175
Ser Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 176
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 176
Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 177
Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 178
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 178
Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 179
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 179
Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr
1 5 10

<210> 180
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 180
Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Gly Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 181
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 181
Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Tyr Thr Tyr
1 5 10

<210> 182
<211> 10
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 182
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 183
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 183
Ser Ile Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5 10

<210> 184
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 184
Arg Ser Ser Ser Tyr Lys Ile Ser Gly Tyr Glu Leu Met Tyr Tyr Glu
1 5 10 15

Tyr Ala Met Asp
20

<210> 185
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 185
Arg Asp Gly Met Tyr Tyr Arg Gly Phe Asp
1 5 10

<210> 186
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 186
Arg Asn Ser Tyr Gly Tyr Arg Ala Leu Asp
1 5 10

<210> 187
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 187
Arg Ala Tyr Ser Met Tyr Pro Trp Asn Val Gly Phe Asp
1 5 10

<210> 188
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 188
Arg Ser Tyr His His Ser Asp Lys Tyr Tyr Tyr Ala Trp Ser Tyr Ala
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 189
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 189
Arg Gly Gly Tyr Trp Tyr Tyr Phe Tyr Asp Gly Gly Ile Asp
1 5 10

<210> 190
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 190
Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Tyr Phe Gly Met Asp
1 5 10

<210> 191
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 191
Arg Ile Gly Ser Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Val His Tyr Asn
1 5 10 15

Gly Met Asp

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 192
Arg Tyr Gly Tyr Ser Gly Lys Gly Phe Asp
1 5 10

<210> 193
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 193
Arg Pro Asn Arg Tyr Gly Leu Val Gly Ser Gly Leu Asp
1 5 10

<210> 194
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 194
Arg Lys Ser Asn Arg Tyr Ser Arg Val Ser Phe Gly Met Asp
1 5 10

<210> 195
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 195
Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
Met
1 5 10 15

Asp

<210> 196
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 196
Arg Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp
1 5 10

<210> 197
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 197
Arg Tyr Ser Tyr Tyr Trp Leu Ala Leu Asp
1 5 10

<210> 198
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 198
Arg Tyr Ser Asp Tyr Tyr Tyr Phe Phe Pro Ser Tyr Val Tyr Gly
Gly

1 5 10 15

Ala Met Asp

<210> 199
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 199
Arg Glu Ser Phe Tyr Tyr Thr Asn Tyr Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 200
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 200

Arg Tyr Phe Trp Ser Tyr Asn Ser Phe Ala Gln Ser Phe Trp Ala Met
1 5 10 15

Asp

<210> 201
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 201

Arg Ser Gln Thr Thr Asp Tyr Leu Gly Phe Tyr Ile Ser Tyr Thr
Gly
1 5 10 15

Ala Leu Asp

<210> 202
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético"

<400> 202
Arg Tyr Gly Phe Tyr Tyr Ser Tyr Glu Tyr Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 203
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 203
Tyr Ser Tyr Ser Tyr Ser Val
1 5

<210> 204
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
Sintético"

<400> 204
Ser Trp Ala Ser Trp
1 5

<210> 205
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 205
Trp Tyr Ala Ser Trp
1 5

<210> 206
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 206
Trp Trp Ala Ser Ser
1 5

<210> 207
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 207
Ser Tyr Ala Ser Tyr
1 5

<210> 208
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 208
Tyr Ser Tyr Ser Leu Leu
1 5

<210> 209
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético"

<400> 209
Tyr Tyr Pro Leu
1

<210> 210
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: etiqueta 6xHis Sintética"

<400> 210
His His His His His His
1 5

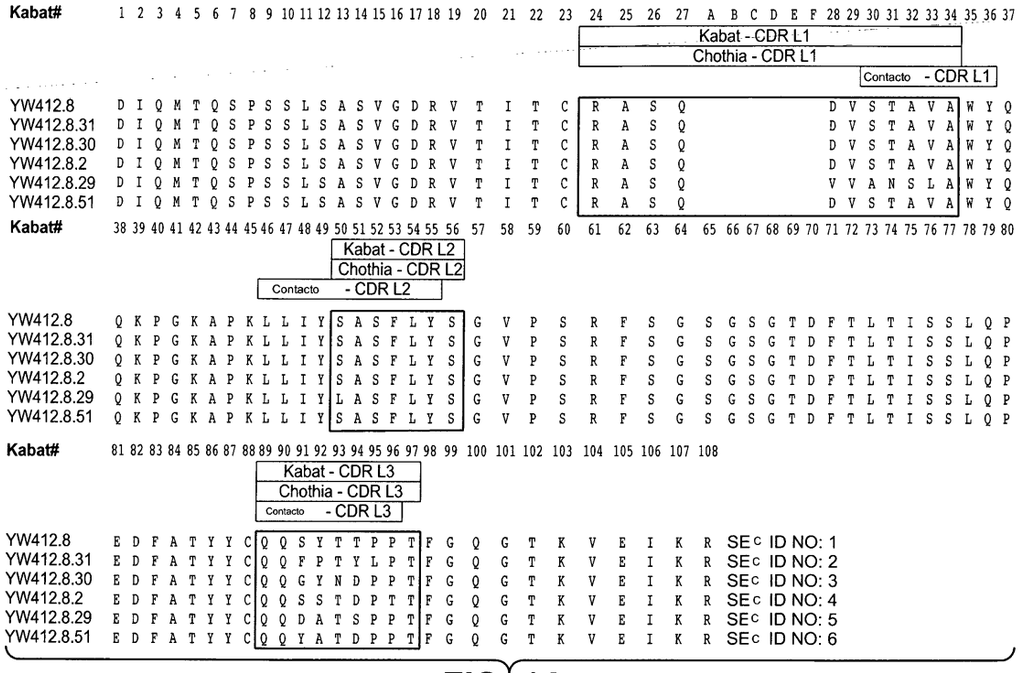

Kabat#
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
YW412.8 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.30 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.2 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.29 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q V V A N S L A W Y Q
YW412.8.51 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
Kabat#
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
YW412.8 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.30 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.2 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.29 Q K P G K A P K L L I Y L A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.51 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
Kabat#
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
YW412.8 E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 1
YW412.8.31 E D F A T Y Y C Q Q F P T Y L P T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 2
YW412.8.30 E D F A T Y Y C Q Q G Y N D P P T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 3
YW412.8.2 E D F A T Y Y C Q Q S S T D P T T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 4
YW412.8.29 E D F A T Y Y C Q Q D A T S P P T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 5
YW412.8.51 E D F A T Y Y C Q Q Y A T D P P T F G Q G T K V E I K R SEQ ID NO: 6

FIG. 1A

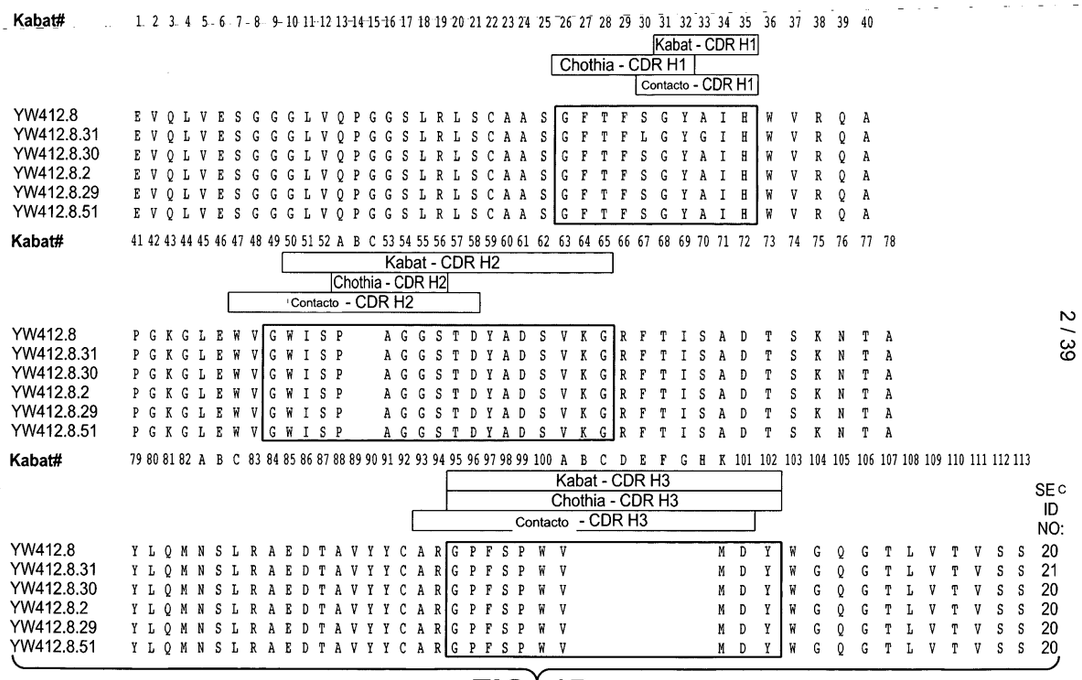

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
YW412.8 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.31 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.30 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.2 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.29 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.51 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
Kabat#
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
YW412.8 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.30 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.2 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.29 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.51 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
Kabat#
79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
SEQ ID NO:
YW412.8 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 20
YW412.8.31 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 21
YW412.8.30 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 20
YW412.8.2 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 20
YW412.8.29 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 20
YW412.8.51 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 20

FIG. 1B

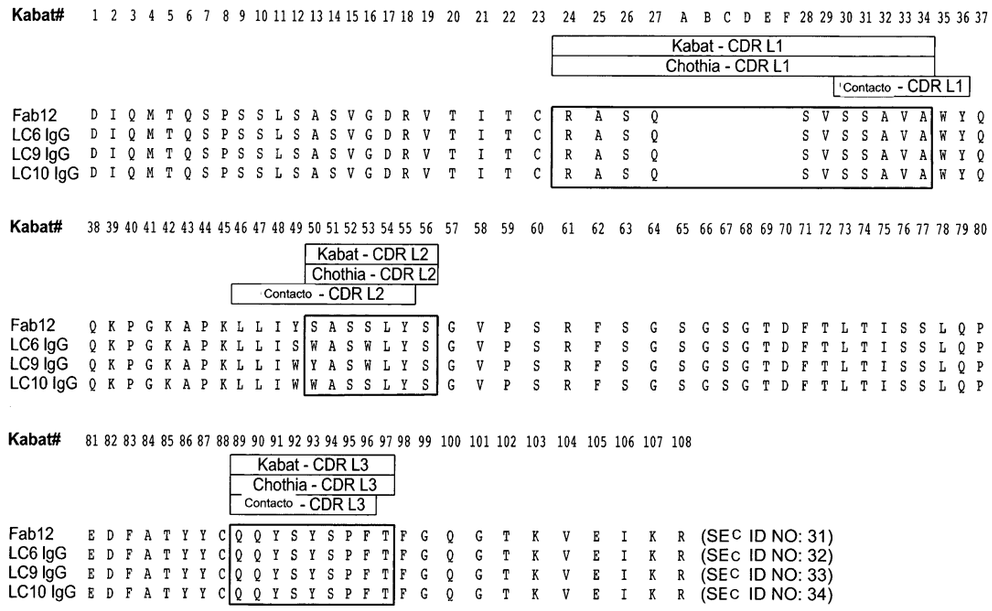

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Fab12 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC6 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC9 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
LC10 IgG D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S V S S A V A W Y Q
Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Fab12 Q K P G K A P K L L I Y S A S S L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC6 IgG Q K P G K A P K L L I S W A S W L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC9 IgG Q K P G K A P K L L I W Y A S W L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
LC10 IgG Q K P G K A P K L L I W W A S S L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
Fab12 E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO: 31)
LC6 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO: 32)
LC9 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO: 33)
LC10 IgG E D F A T Y Y C Q Q Y S Y S P F T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO: 34)

FIG. 2A

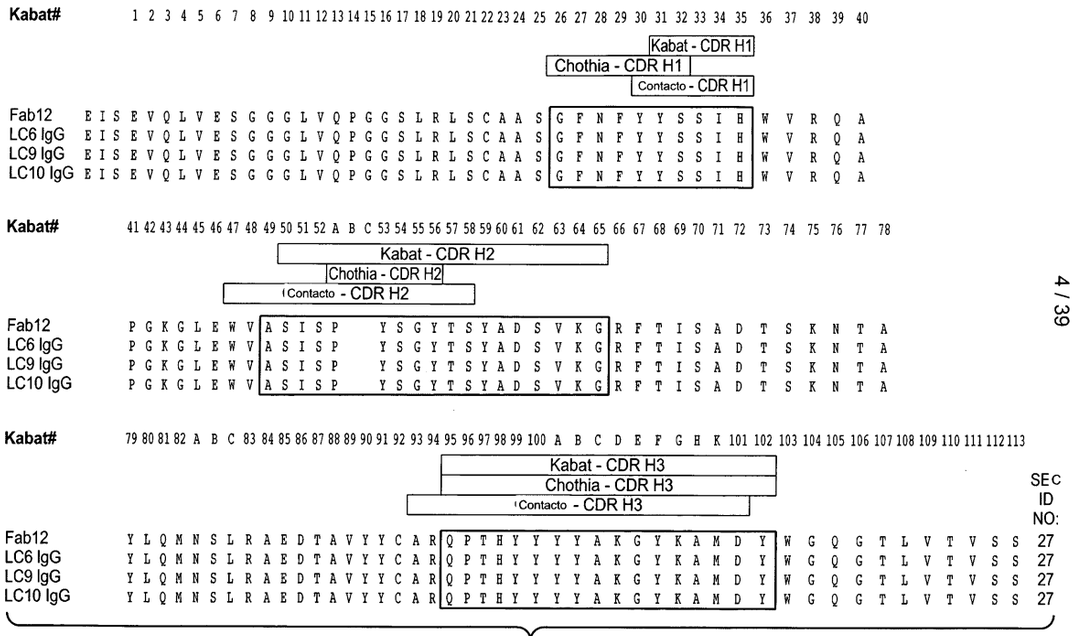

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
Fab12 E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC6 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC9 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
LC10 IgG E I S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N F Y Y S S I H W V R Q A
Kabat#
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
Fab12 P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC6 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC9 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
LC10 IgG P G K G L E W V A S I S P Y S G Y T S Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
Kabat#
79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
SEQ ID NO:
Fab12 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC6 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC9 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27
LC10 IgG Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q P T H Y Y Y Y A K G Y K A M D Y W G Q G T L V T V S S 27

FIG. 2B

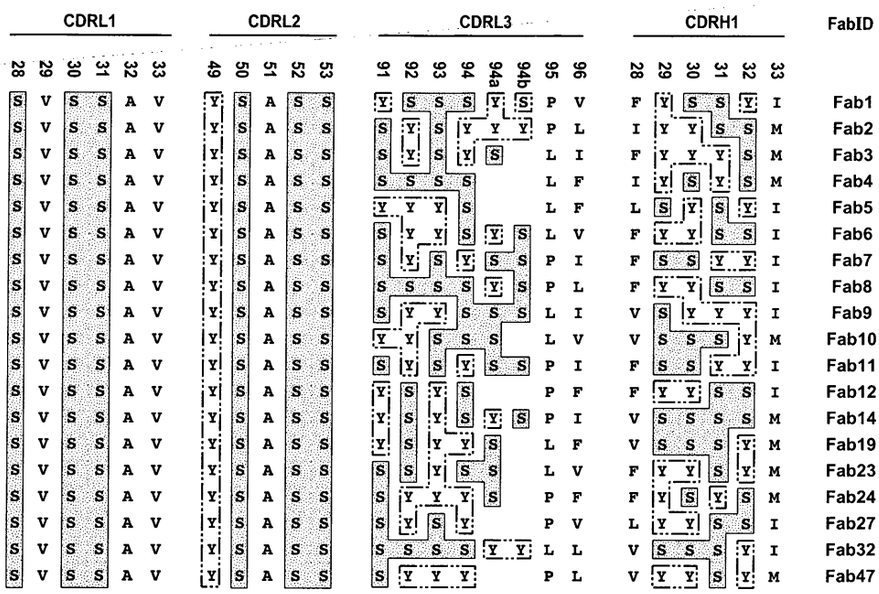

CDRL1
CDRL2
CDRL3
CDRH1
FabID
28 29 30 31 32 33
49 50 51 52 53
91 92 93 94 94a 94b 95 96
28 29 30 31 32 33
Fab1
Fab2
Fab3
Fab4
Fab5
Fab6
Fab7
Fab8
Fab9
Fab10
Fab11
Fab12
Fab14
Fab19
Fab23
Fab24
Fab27
Fab32
Fab47

FIG. 3A

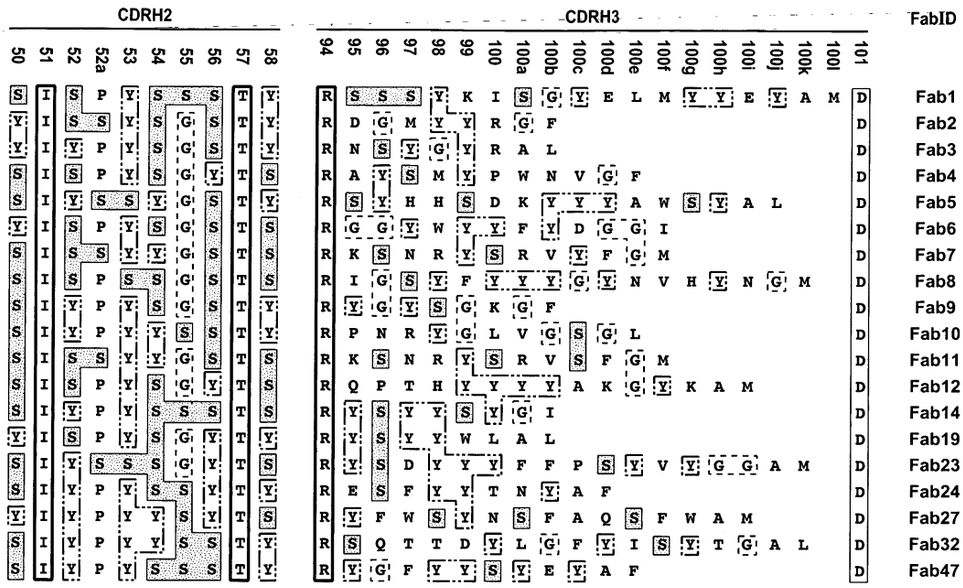

CDRH2
CDRH3
FabID
50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58
94 95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 100e 100f 100g 100h 100i 100j 100k 100l 101
Fab1
Fab2
Fab3
Fab4
Fab5
Fab6
Fab7
Fab8
Fab9
Fab10
Fab11
Fab12
Fab14
Fab19
Fab23
Fab24
Fab27
Fab32
Fab47

FIG. 3B

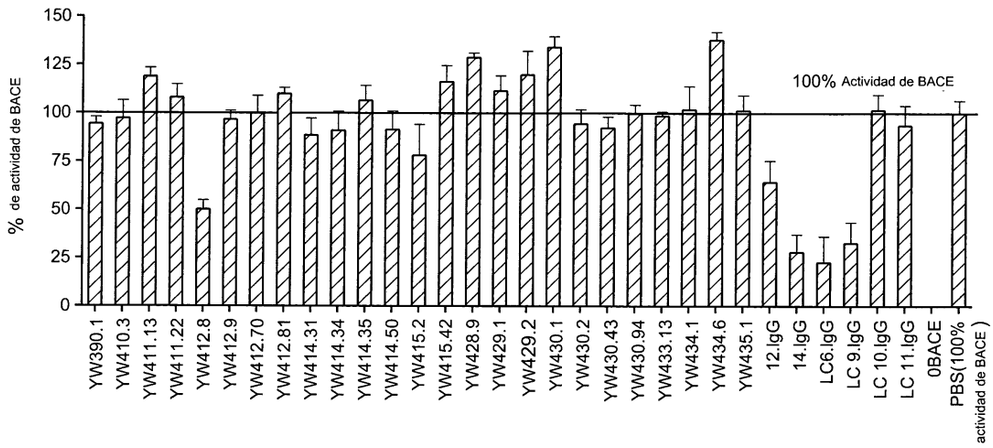

% de actividad de BACE
150
125
100
75
50
25
0
100% Actividad de BACE
YW390.1
YW410.3
YW411.13
YW411.22
YW412.8
YW412.9
YW412.70
YW412.81
YW414.31
YW414.34
YW414.35
YW414.50
YW415.2
YW415.42
YW428.9
YW429.1
YW429.2
YW430.1
YW430.2
YW430.43
YW430.94
YW433.13
YW434.1
YW434.6
YW435.1
12.IgG
14.IgG
LC6.IgG
LC 9.IgG
LC 10.IgG
LC 11.IgG
0BACE
PBS(100% actividad de BACE)

FIG. 4

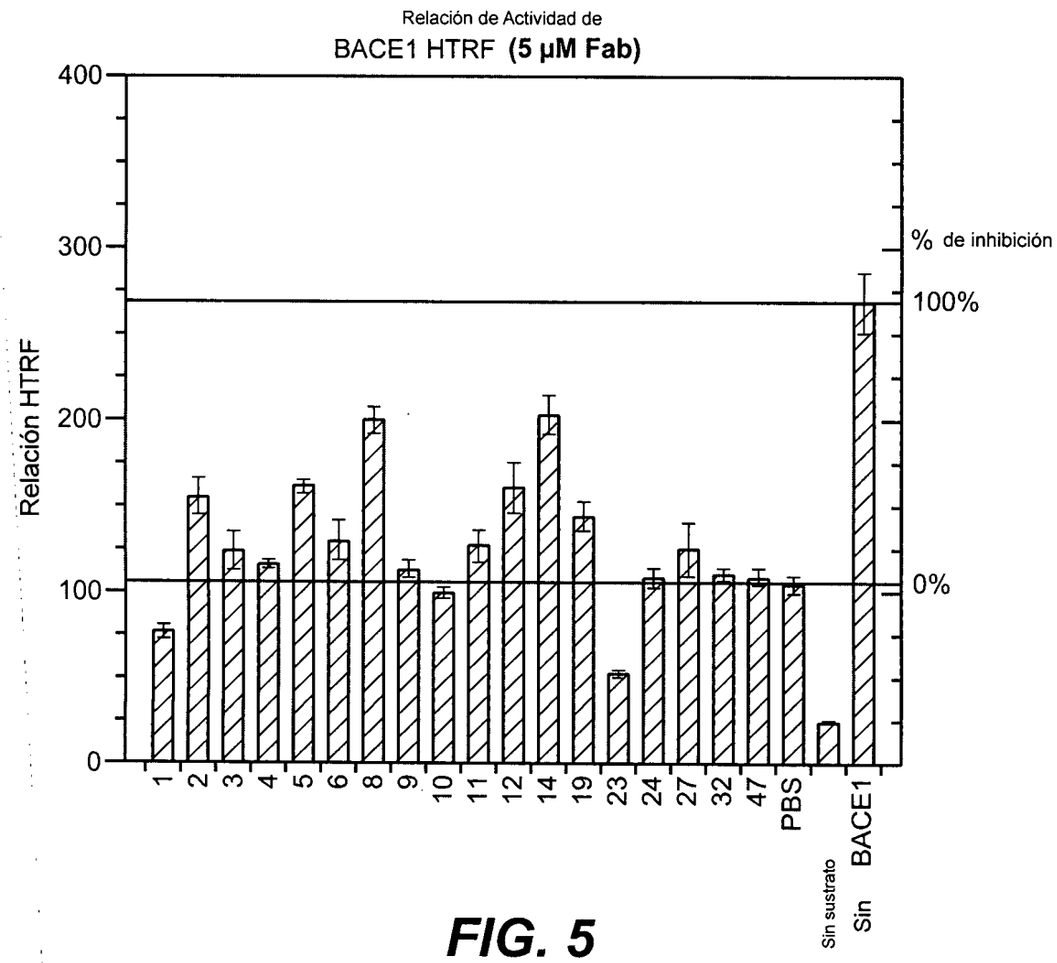

Relación de Actividad de
BACE1 HTRF (5 µM Fab)
Relación HTRF
400
300
200
100
0
% de inhibición
100%
0%
1
2
3
4
5
6
8
9
10
11
12
14
19
23
24
27
32
47
PBS
Sin sustrato
Sin BACE1

FIG. 5

CDRL1								CDRL2					CDRL3									CDRH1						Relación de ELISA de competición	Fab ID	Progenitor
28	29	30	31	32	33	33a		49	50	51	52	53	91	92	93	94	94a	94b	95	96		28	29	30	31	32	33			
S	V	S	S	A	V			Y	S	A	S	S	Y	S	Y	S			L	L		L	S	Y	S	Y	I		6.3	LC4	Fab5
S	V	S	S	A	V			Y	S	A	S	S	Y	Y					P	L		L	S	Y	S	Y	I		4.4	LC11	Fab5
S	V	S	S	A	V			S	W	A	S	W	Y	S	Y	S			P	F		F	Y	Y	S	S	I		4	LC6	Fab12
S	V	S	S	A	V			W	Y	A	S	W	Y	S	Y	S			P	F		F	Y	Y	S	S	I		11.7	LC9	Fab12
S	V	S	S	A	V			N	W	A	S	S	Y	S	Y	S			P	F		F	Y	Y	S	S	I		7.8	LC10	Fab12
Y	S	Y	S	Y	S	V		S	Y	A	S	Y	Y	S	Y	S	Y	S	P	I		V	S	S	S	S	M		3	LC40	Fab14

CDRH2										CDRH3																					
50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	101				
S	I	Y	S	S	Y	G	S	T	Y	R	S	Y	H	H	S	D	K	Y	Y	Y	A	W	S	Y	A	L	D			LC4	Fab5
S	I	Y	S	S	Y	G	S	T	Y	R	S	Y	H	H	S	D	K	Y	Y	Y	A	W	S	Y	A	L	D			LC11	Fab5
S	I	S	P	Y	S	G	Y	T	S	R	Q	P	T	H	Y	Y	Y	Y	A	K	G	Y	K	A	M		D			LC6	Fab12
S	I	S	P	Y	S	G	Y	T	S	R	Q	P	T	H	Y	Y	Y	Y	A	K	G	Y	K	A	M		D			LC9	Fab12
S	I	S	P	Y	S	G	Y	T	S	R	Q	P	T	H	Y	Y	Y	Y	A	K	G	Y	K	A	M		D			LC10	Fab12
S	I	Y	P	Y	S	S	S	T	S	R	Y	S	Y	Y	S	Y	G	I									D			LC40	Fab14

FIG. 6

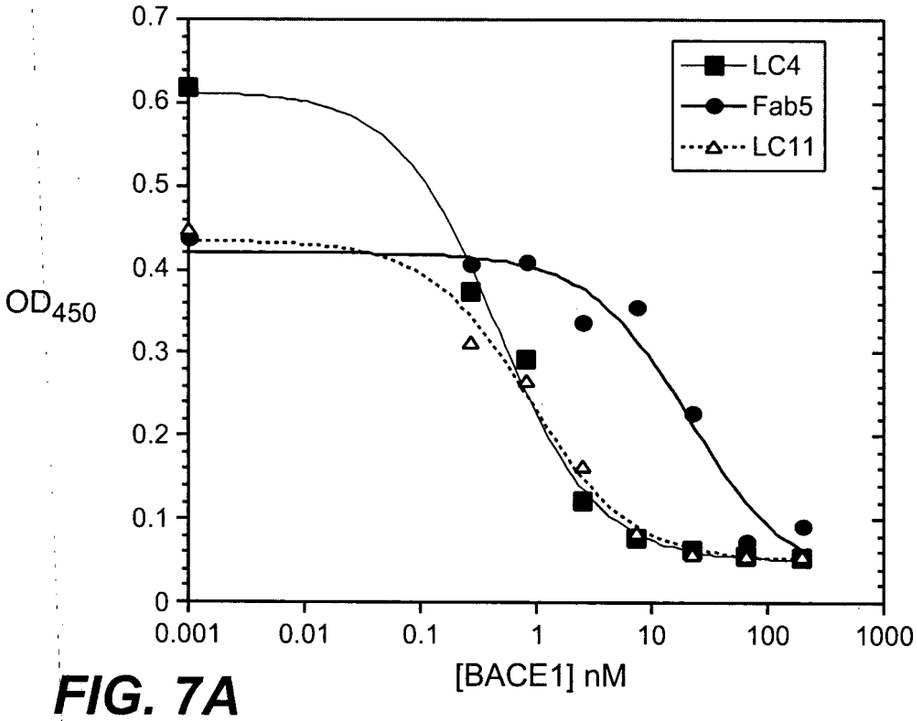

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD450
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[BACE1] nM
LC4
Fab5
LC11

FIG. 7A

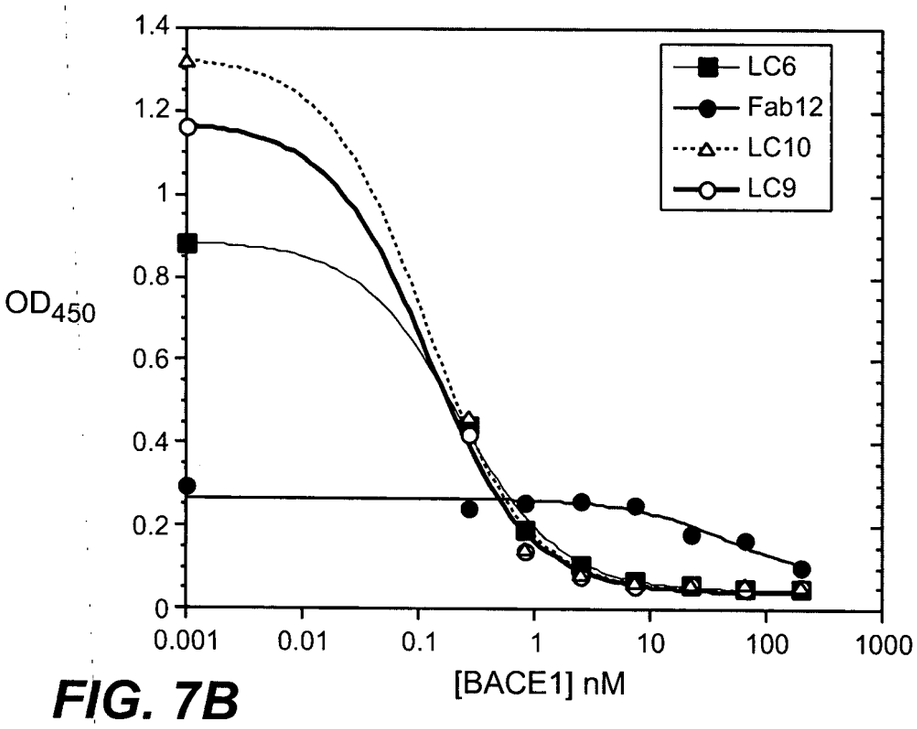

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD450
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[BACE1] nM
LC6
Fab12
LC10
LC9

FIG. 7B

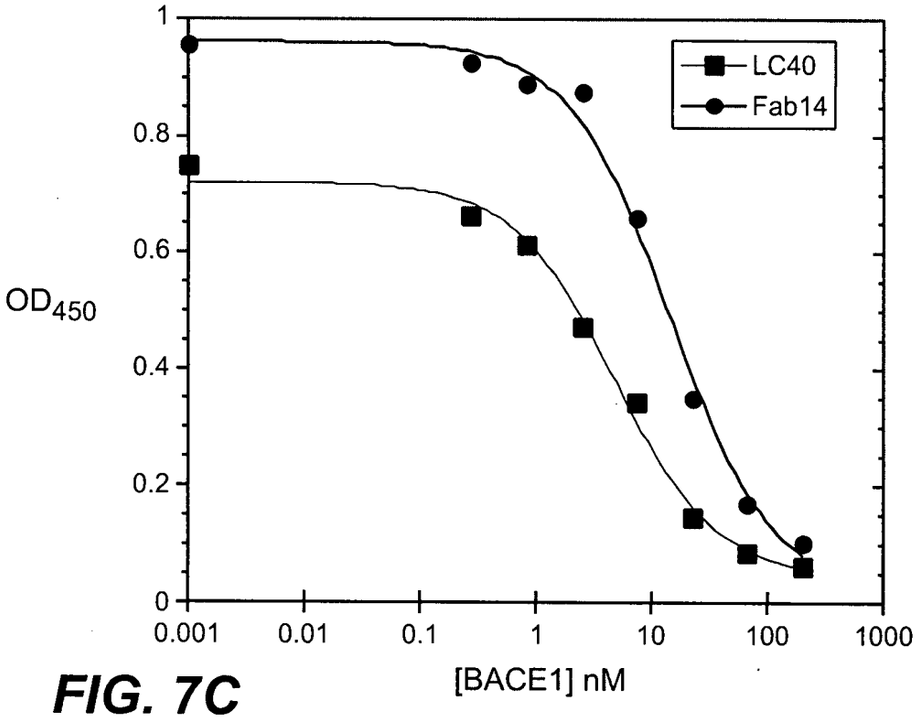

LC40
Fab14
OD_{450}
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[BACE1] nM

FIG. 7C

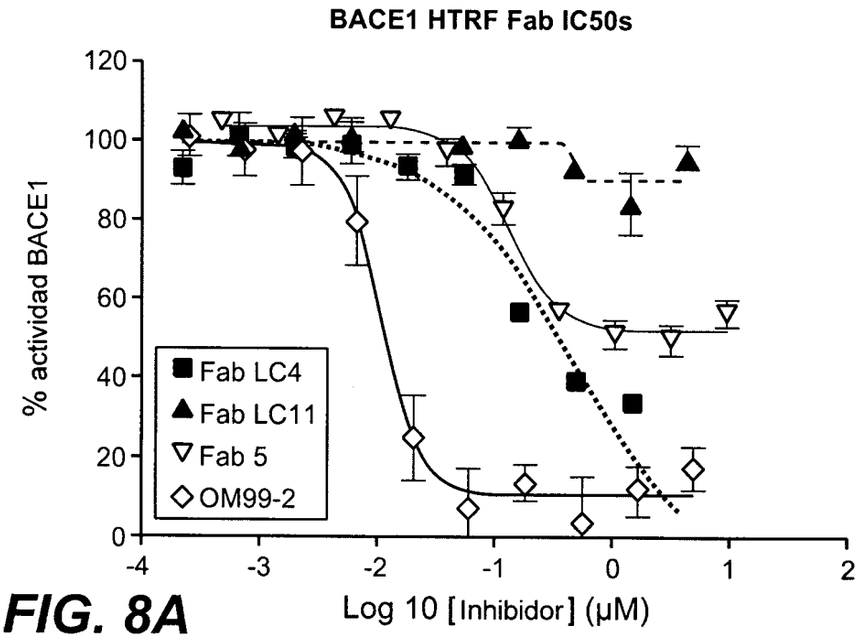

BACE1 HTRF Fab IC50s
% actividad BACE1
120
100
80
60
40
20
0
Fab LC4
Fab LC11
Fab 5
OM99-2
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log 10 [Inhibidor] (µM)

FIG. 8A

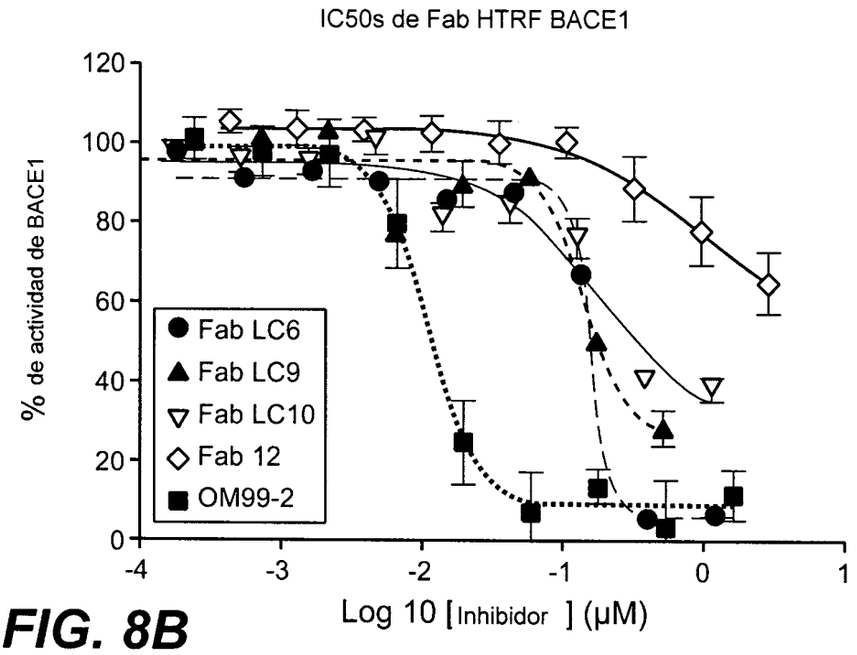

IC50s de Fab HTRF BACE1
% de actividad de BACE1
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
Log 10 [Inhibidor] (µM)
Fab LC6
Fab LC9
Fab LC10
Fab 12
OM99-2

FIG. 8B

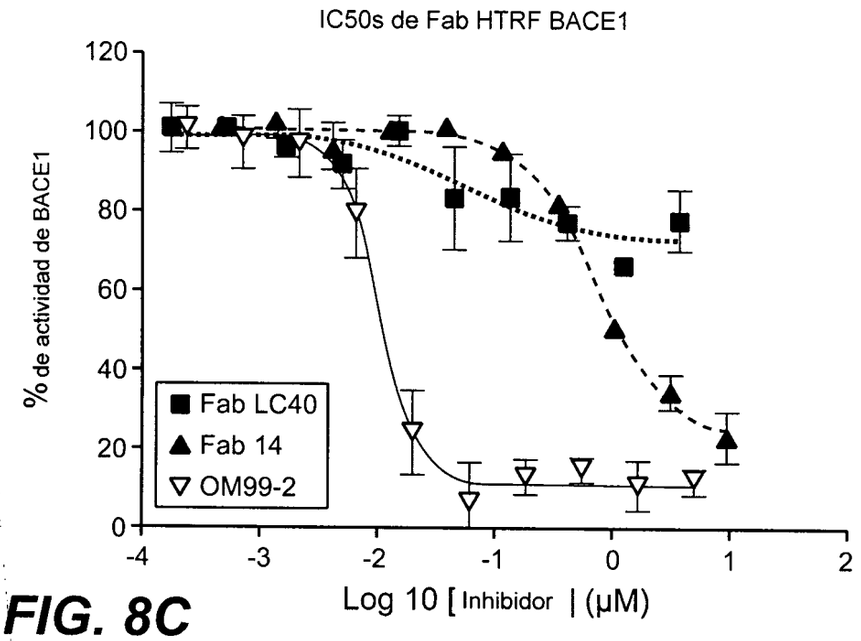

IC50s de Fab HTRF BACE1
% de actividad de BACE1
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log 10 [Inhibidor] (µM)
Fab LC40
Fab 14
OM99-2

FIG. 8C

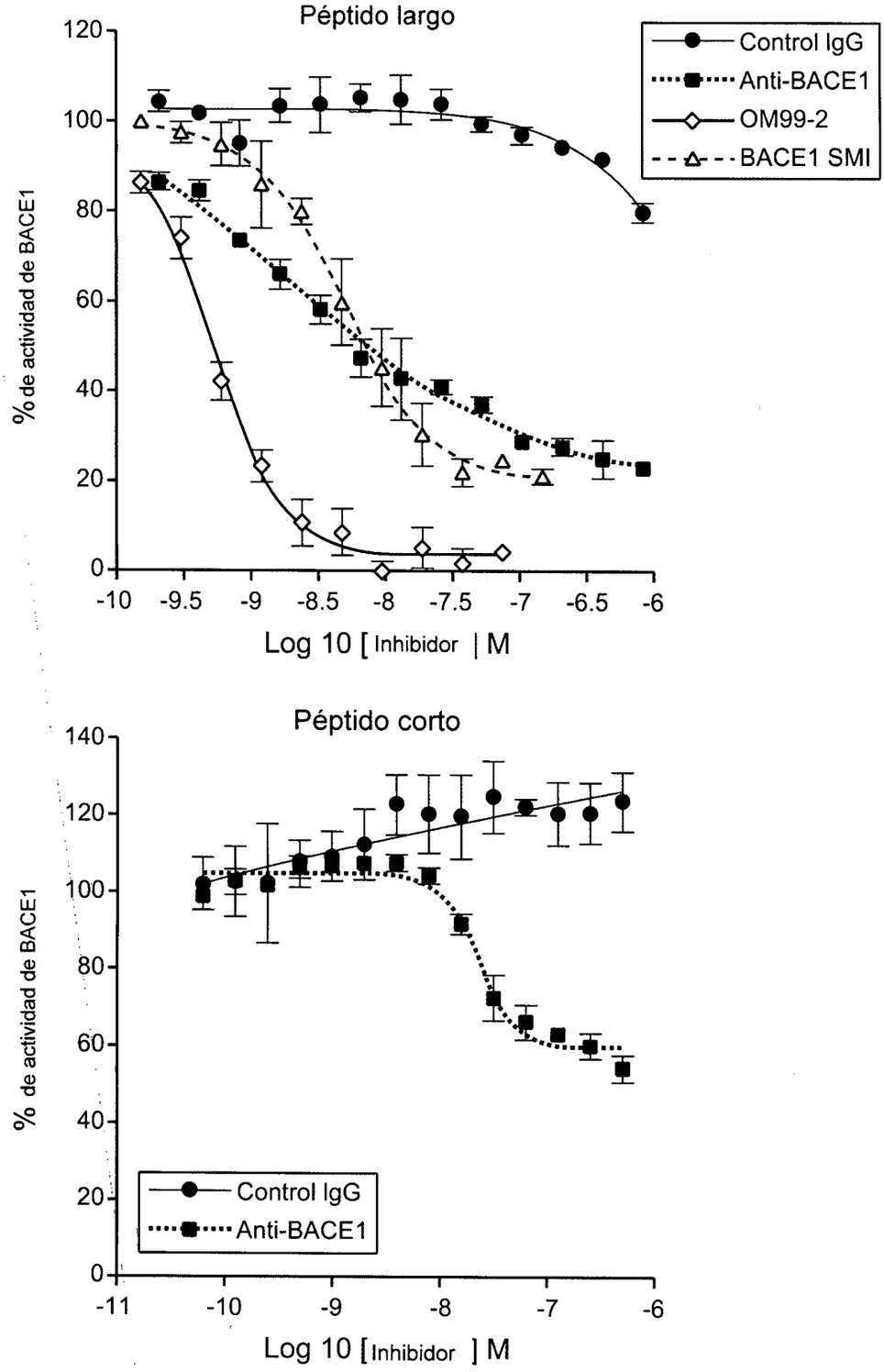

Péptido largo
Control IgG
Anti-BACE1
OM99-2
BACE1 SMI
% de actividad de BACE1
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9.5
-9
-8.5
-8
-7.5
-7
-6.5
-6
Log 10 [Inhibidor | M
Péptido corto
% de actividad de BACE1
140
120
100
80
60
40
20
0
Control IgG
Anti-BACE1
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log 10 [Inhibidor] M

FIG. 9A

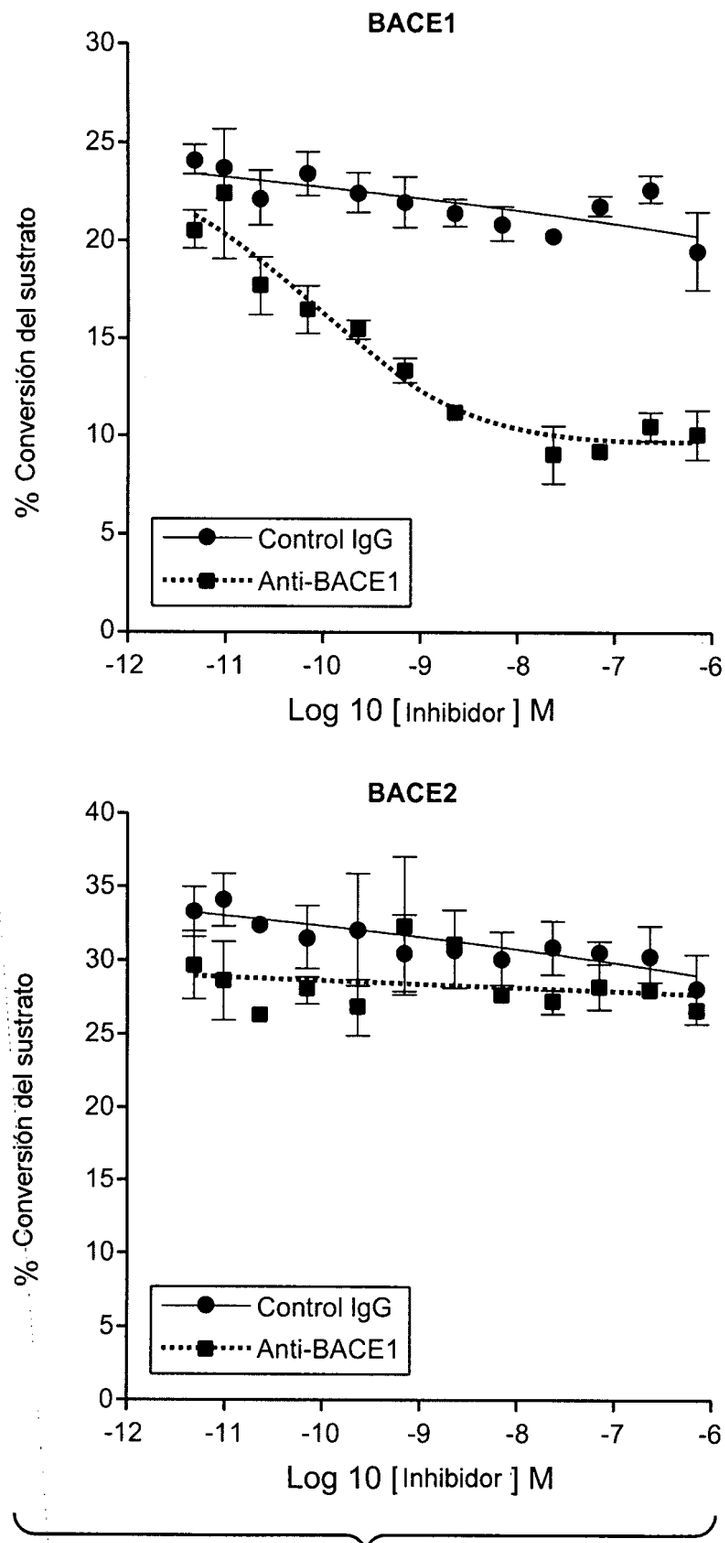

BACE1
% Conversión del sustrato
30
25
20
15
10
5
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log 10 [Inhibidor] M
Control IgG
Anti-BACE1
BACE2
% Conversión del sustrato
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log 10 [Inhibidor] M
Control IgG
Anti-BACE1

FIG. 9B-1

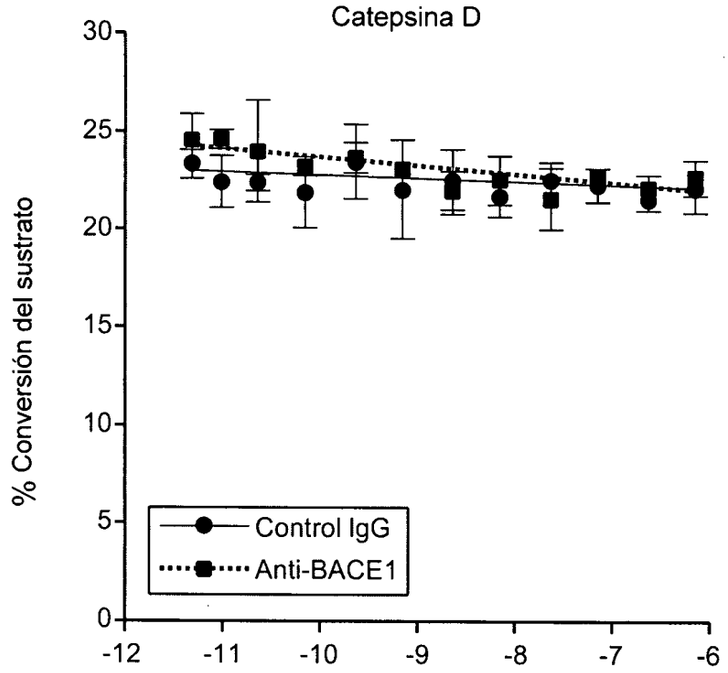


FIG. 9B-2

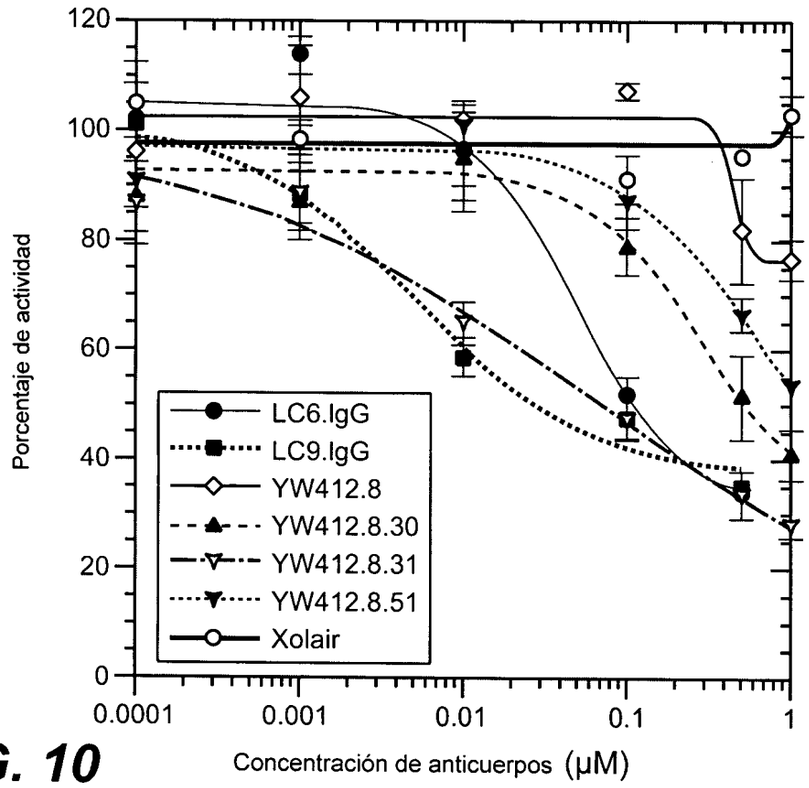


FIG. 10

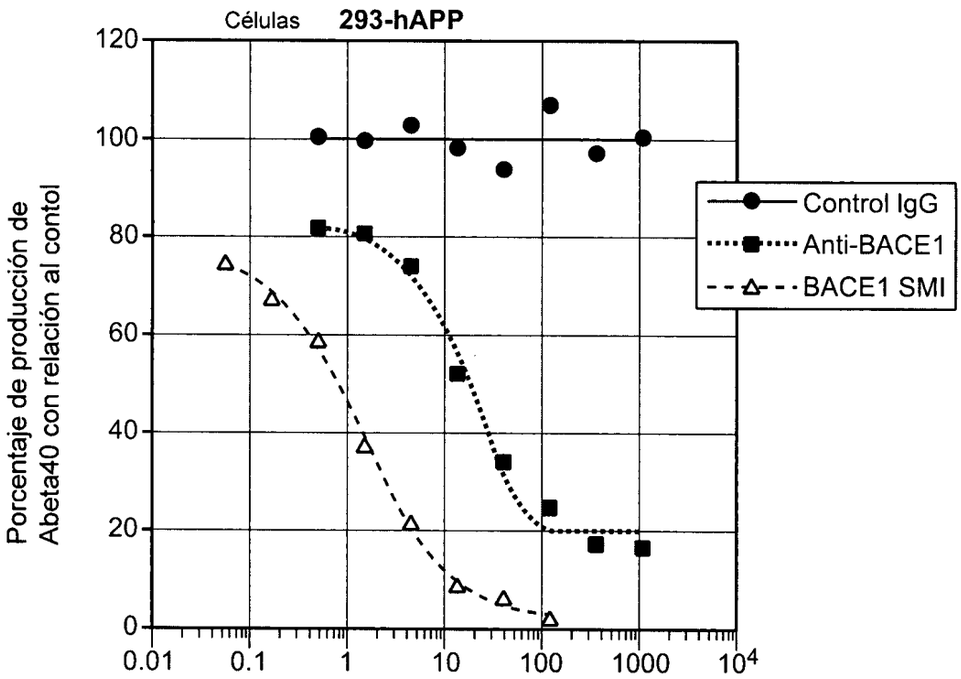


FIG. 11A

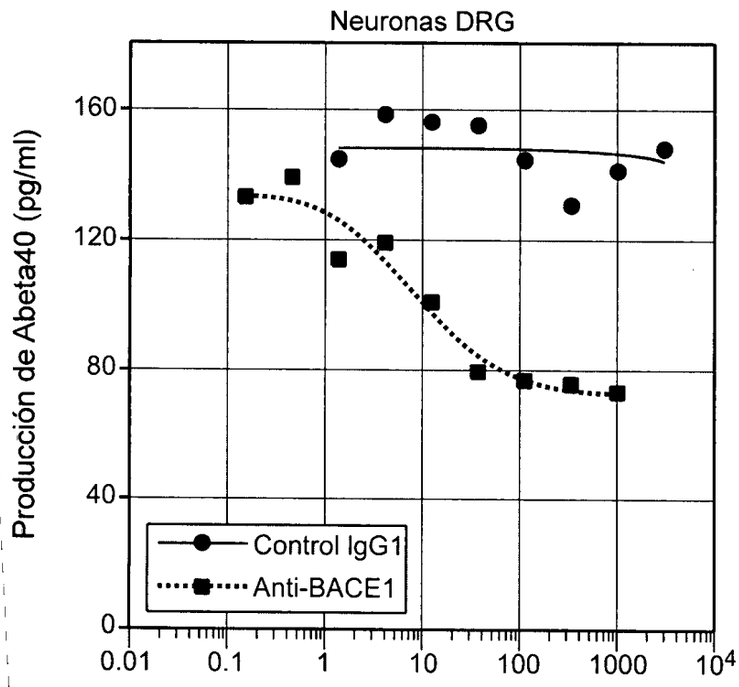


FIG. 11B

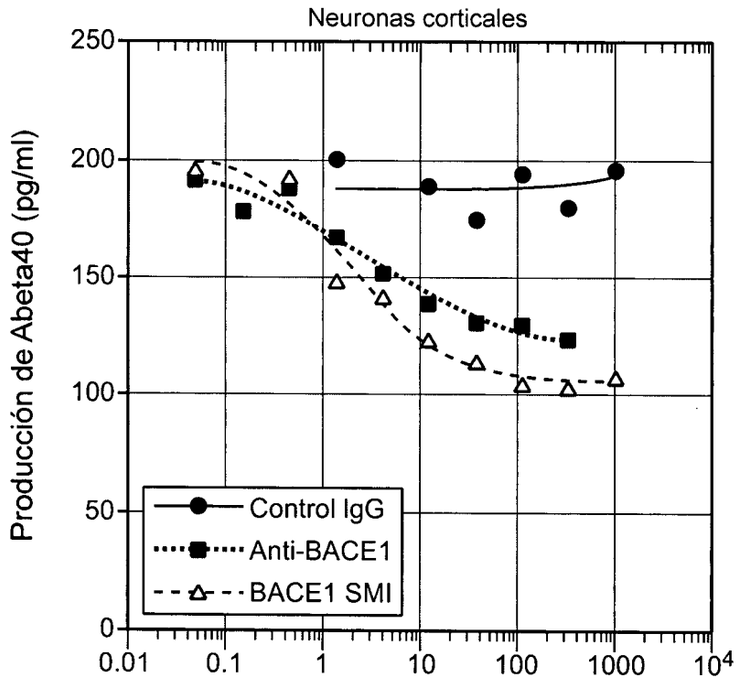


FIG. 11C

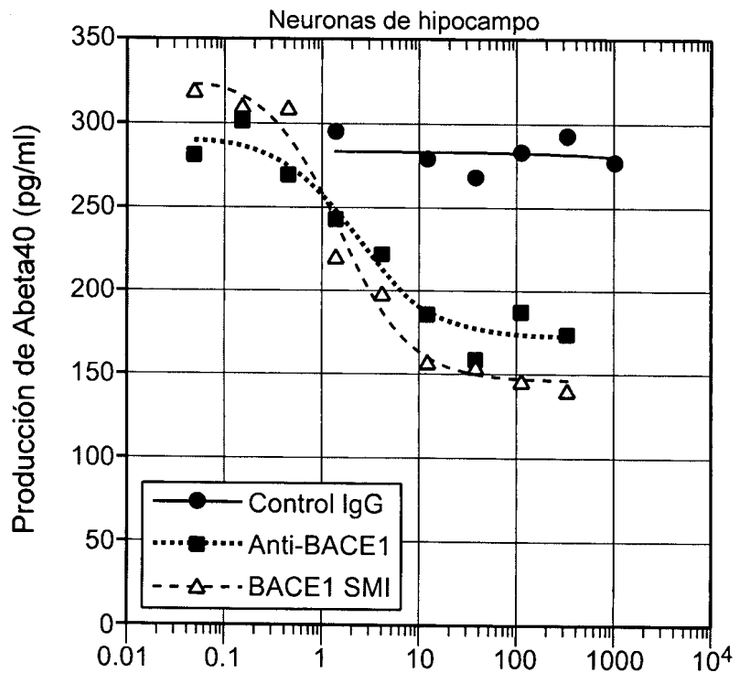


FIG. 11D

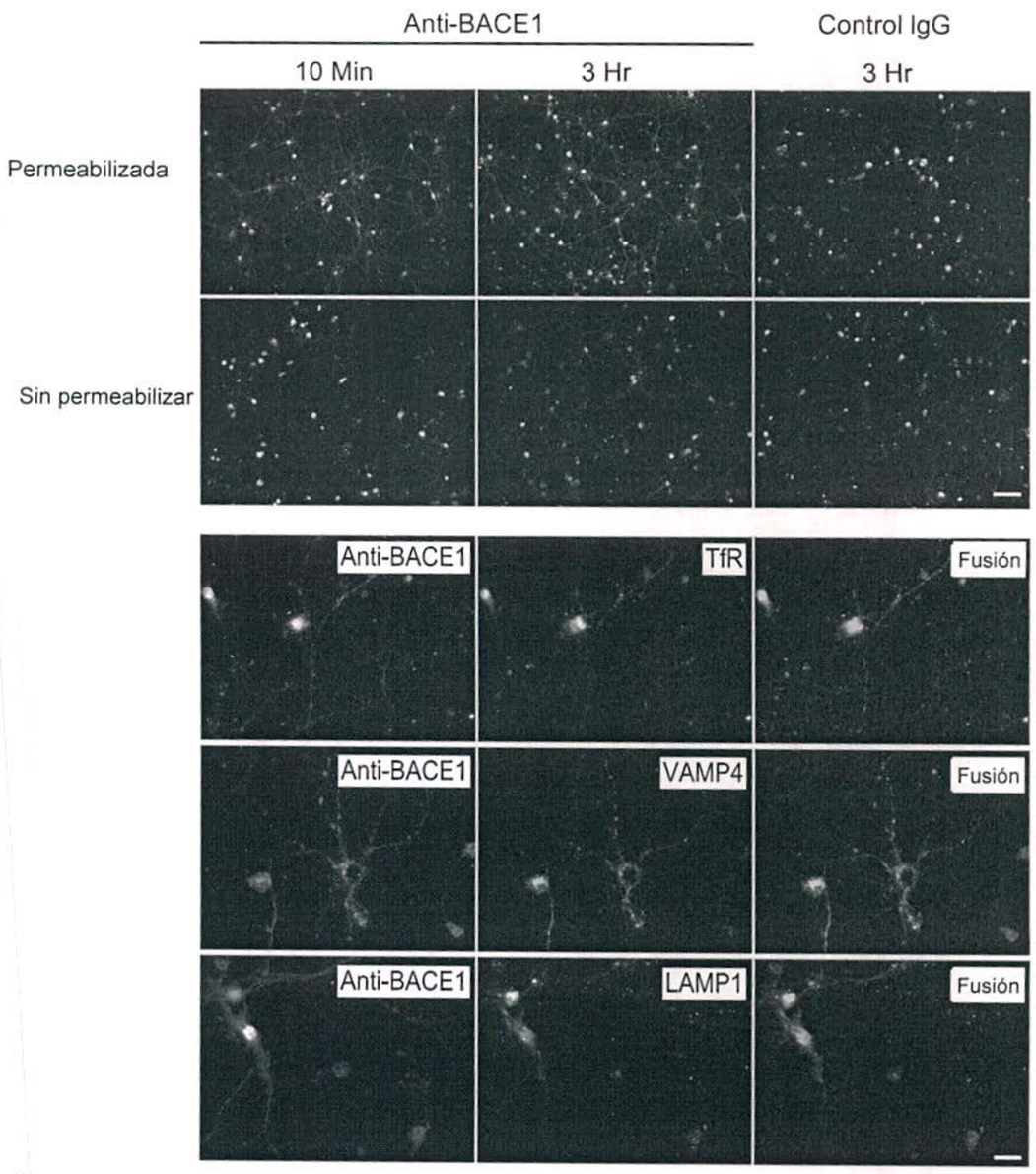

Anti-BACE1
Control IgG
10 Min
3 Hr
3 Hr
Permeabilizada
Sin permeabilizar
Anti-BACE1
TfR
Fusión
Anti-BACE1
VAMP4
Fusión
Anti-BACE1
LAMP1
Fusión

FIG. 12A

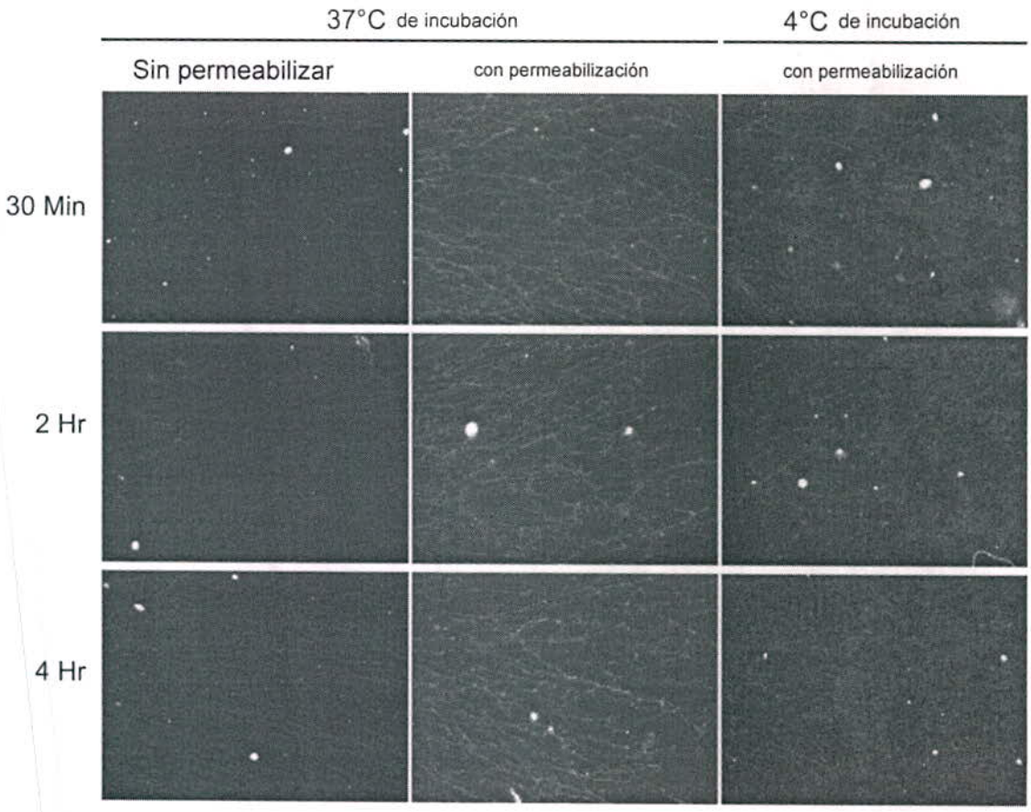


FIG. 12B

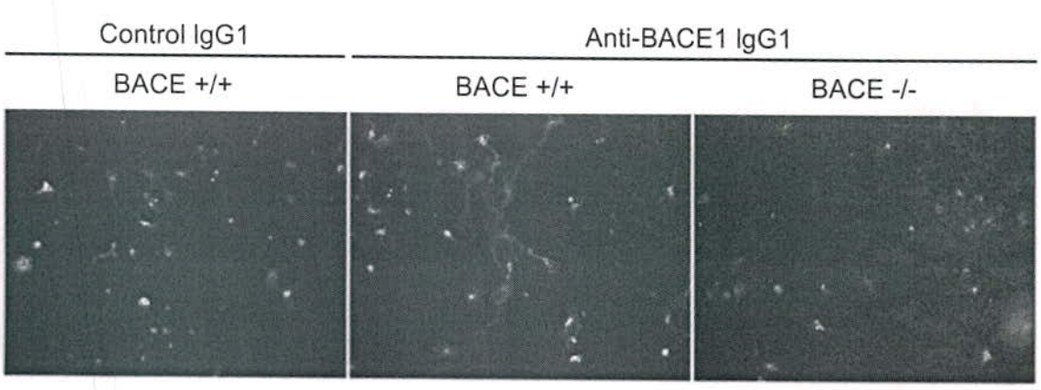


FIG. 12C

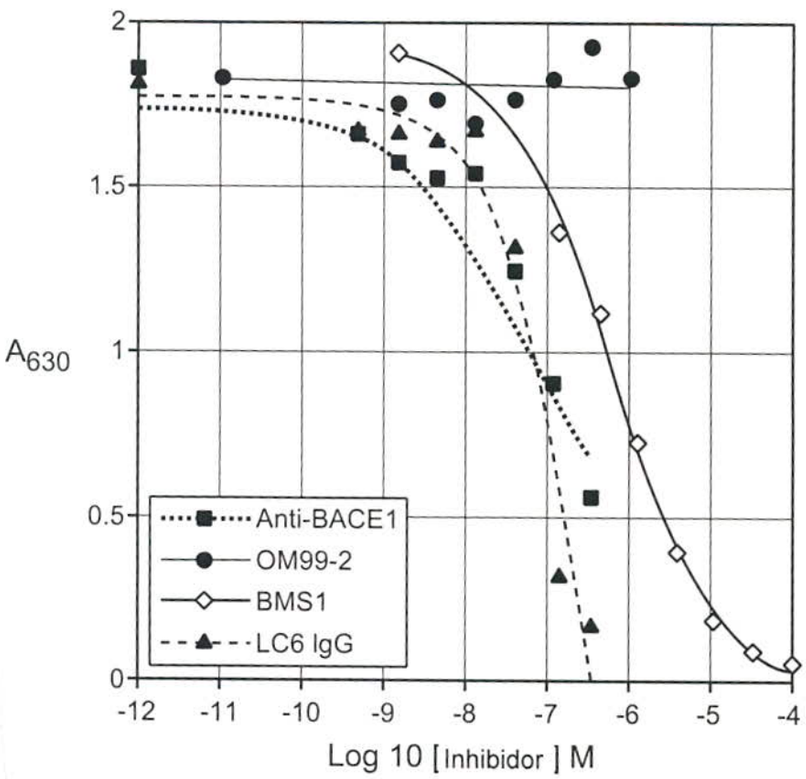

2
1.5
1
0.5
0
A_{630}
Anti-BACE1
OM99-2
BMS1
LC6 IgG
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Log 10 [Inhibidor] M

FIG. 13

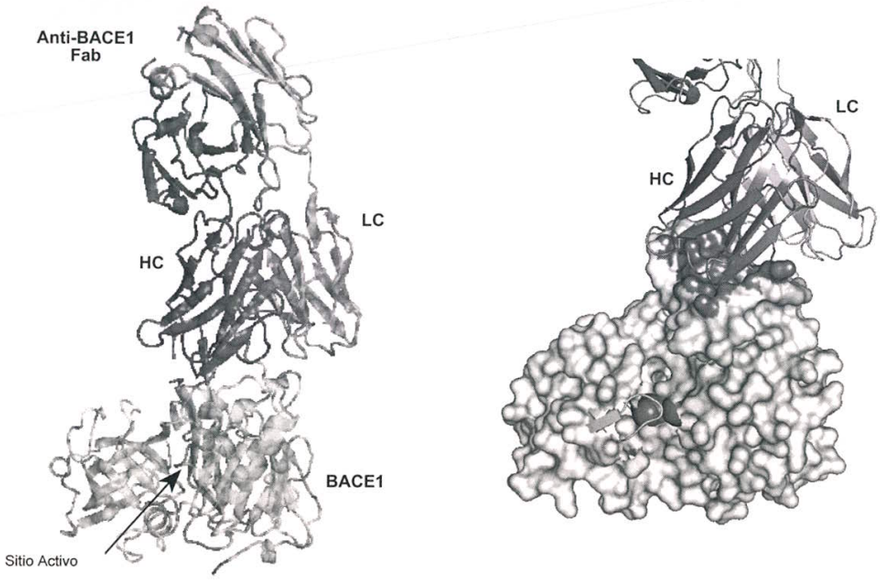


FIG. 14

264

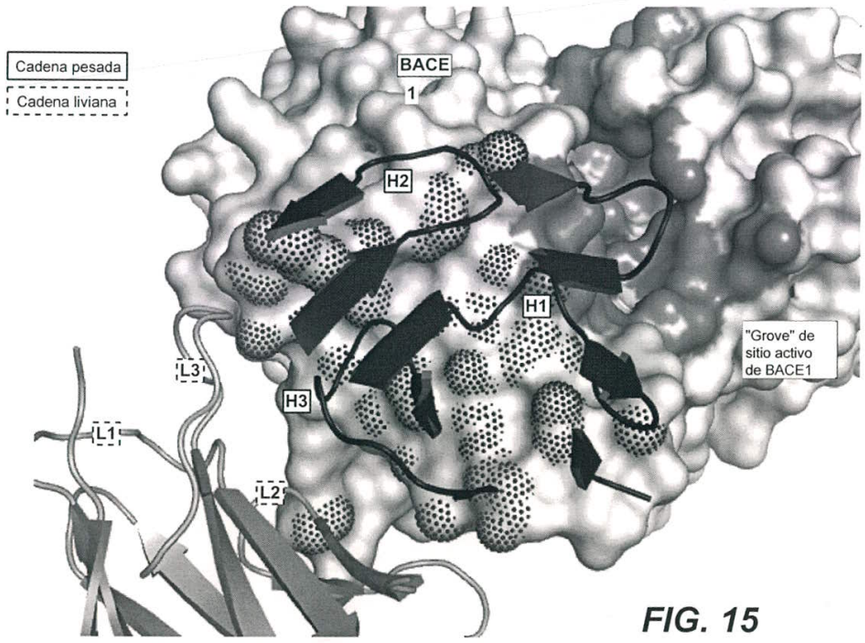

Cadena pesada
Cadena liviana
BACE
1
H2
H1
H3
L3
L1
L2
"Grove" de
sitio activo
de BACE1

FIG. 15

265

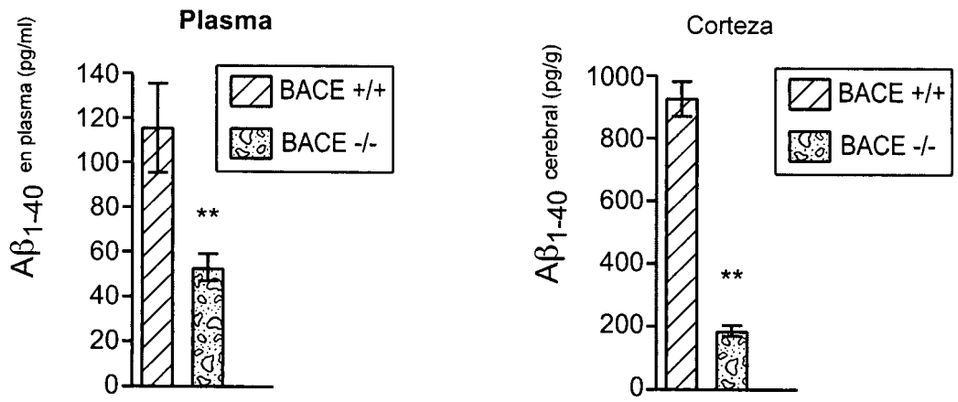


FIG. 16A

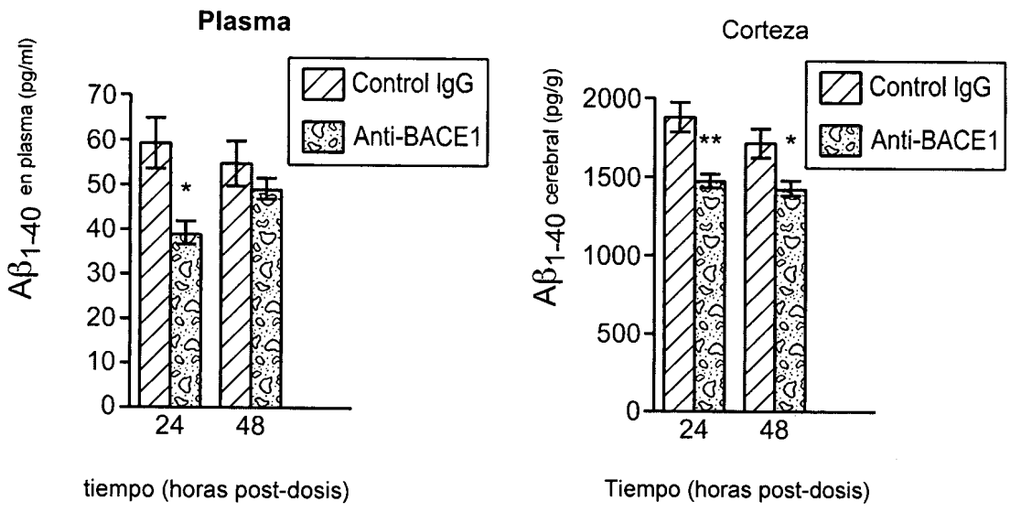


FIG. 16B

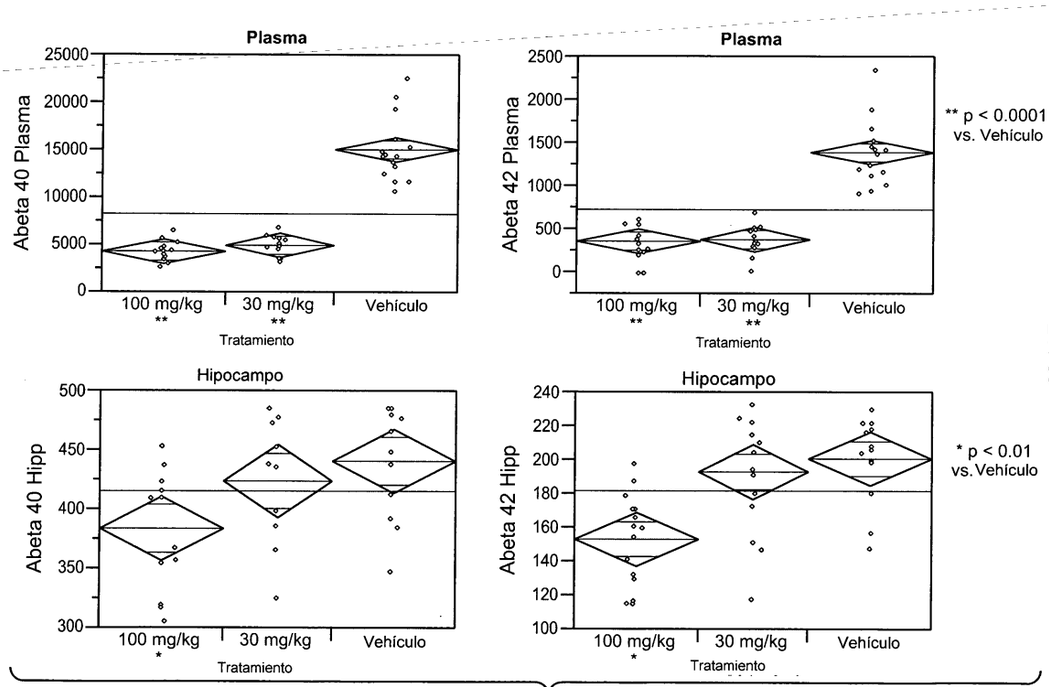

Plasma
Abeta 40 Plasma
25000
20000
15000
10000
5000
0
100 mg/kg
30 mg/kg
Vehículo
**
**
Tratamiento
Plasma
Abeta 42 Plasma
2500
2000
1500
1000
500
0
100 mg/kg
30 mg/kg
Vehículo
**
**
Tratamiento
** p < 0.0001
vs. Vehículo
Hipocampo
Abeta 40 Hipp
500
450
400
350
300
100 mg/kg
30 mg/kg
Vehículo
*
Tratamiento
Hipocampo
Abeta 42 Hipp
240
220
200
180
160
140
120
100
100 mg/kg
30 mg/kg
Vehículo
*
Tratamiento
* p < 0.01
vs. Vehículo

FIG. 17A

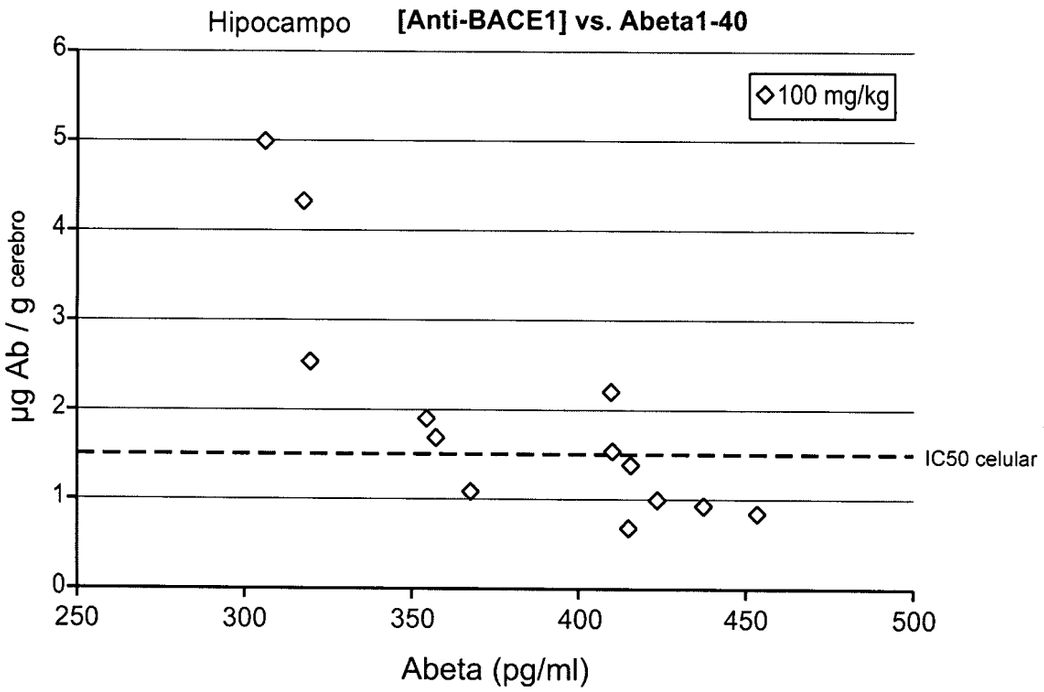

Hipocampo
[Anti-BACE1] vs. Abeta1-40
100 mg/kg
IC50 celular
µg Ab / g cerebro
Abeta (pg/ml)
0
1
2
3
4
5
6
250
300
350
400
450
500

FIG. 17B

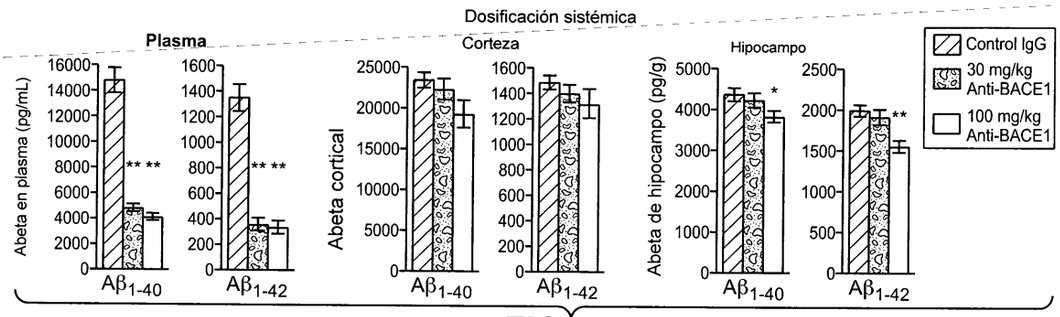


FIG. 18A

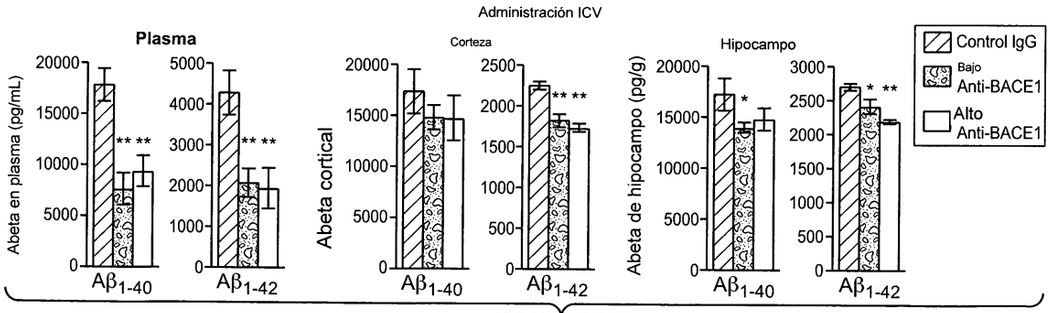


FIG. 18B

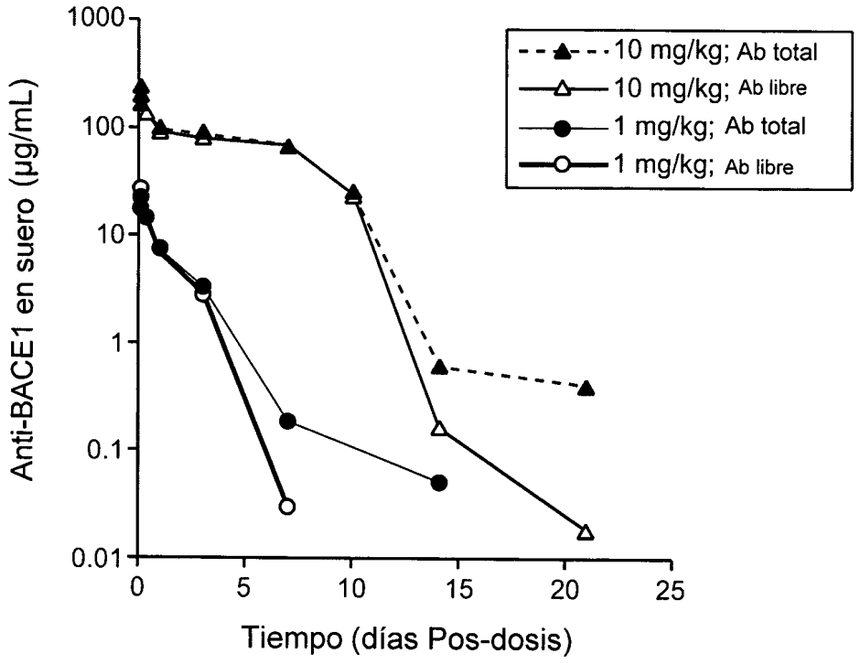


FIG. 19A

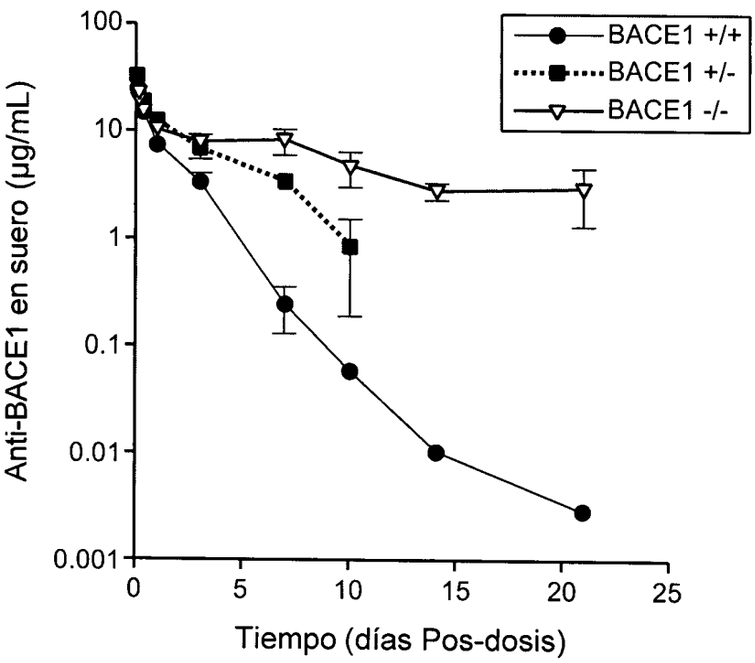


FIG. 19B

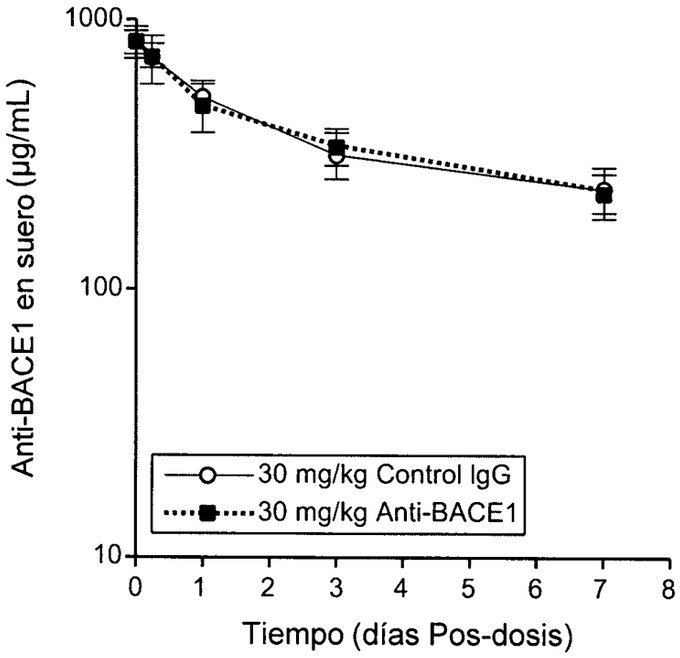


FIG. 20A

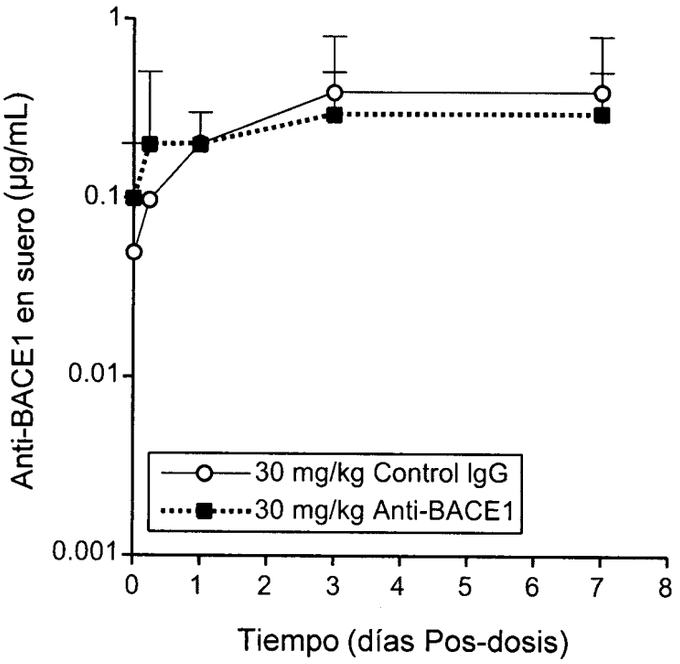


FIG. 20B

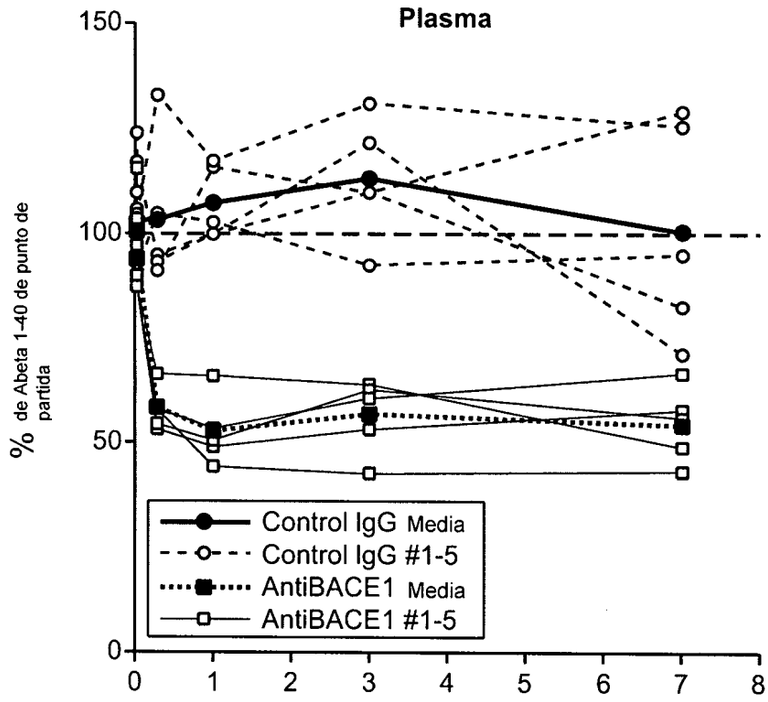


FIG. 21A

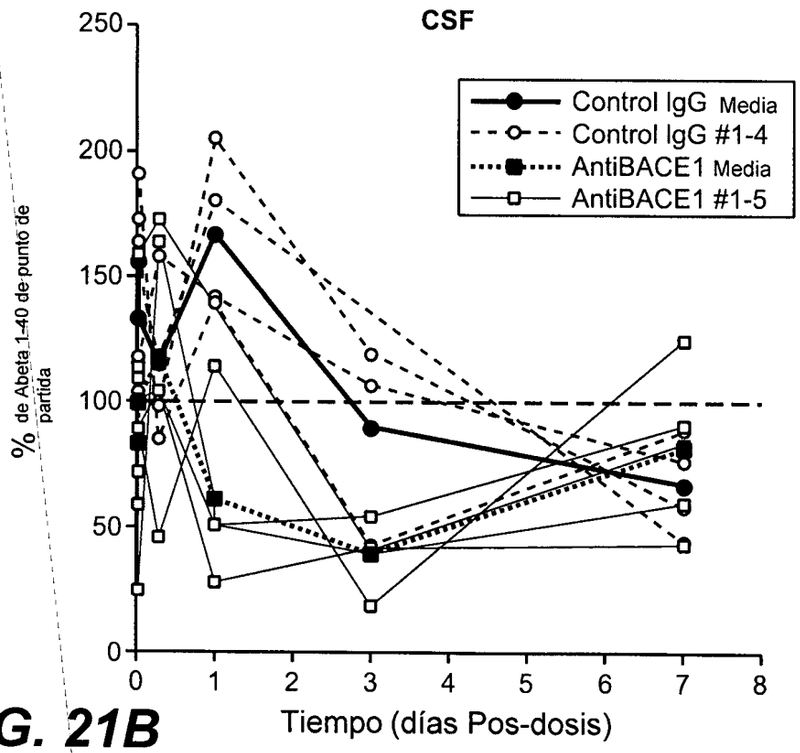


FIG. 21B

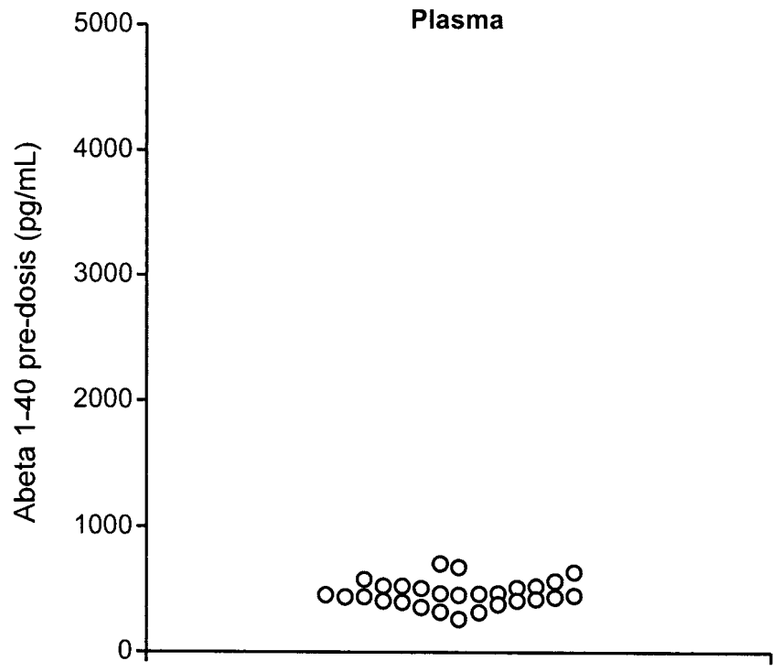


FIG. 21C

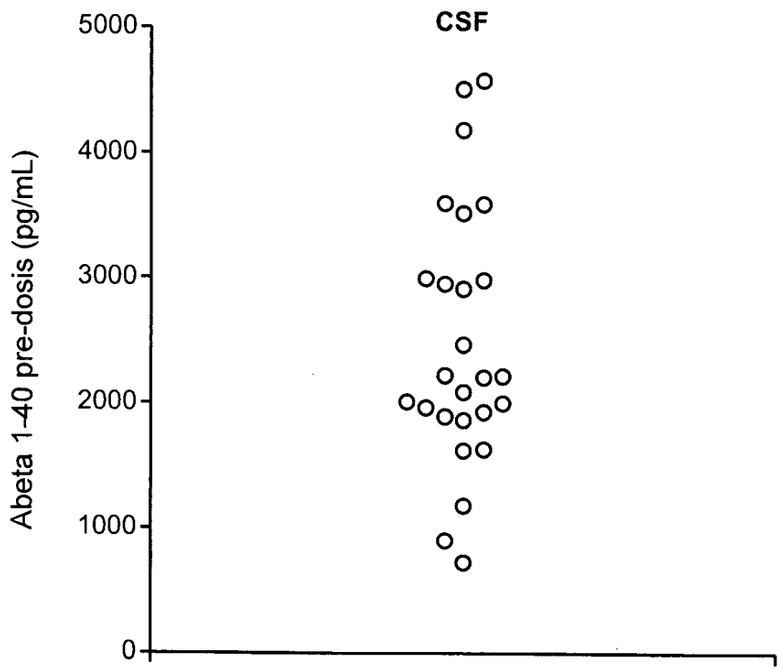


FIG. 21D

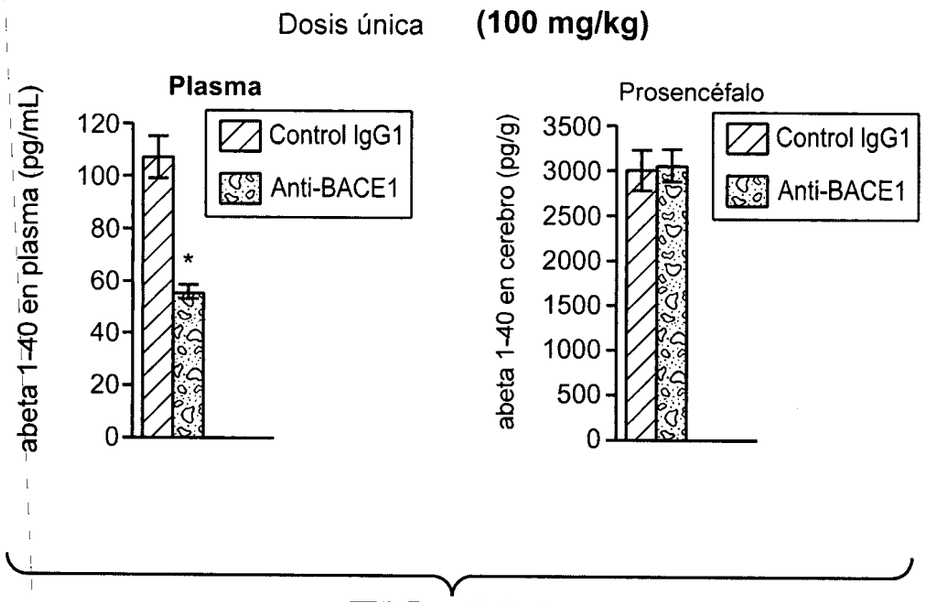


FIG. 22A

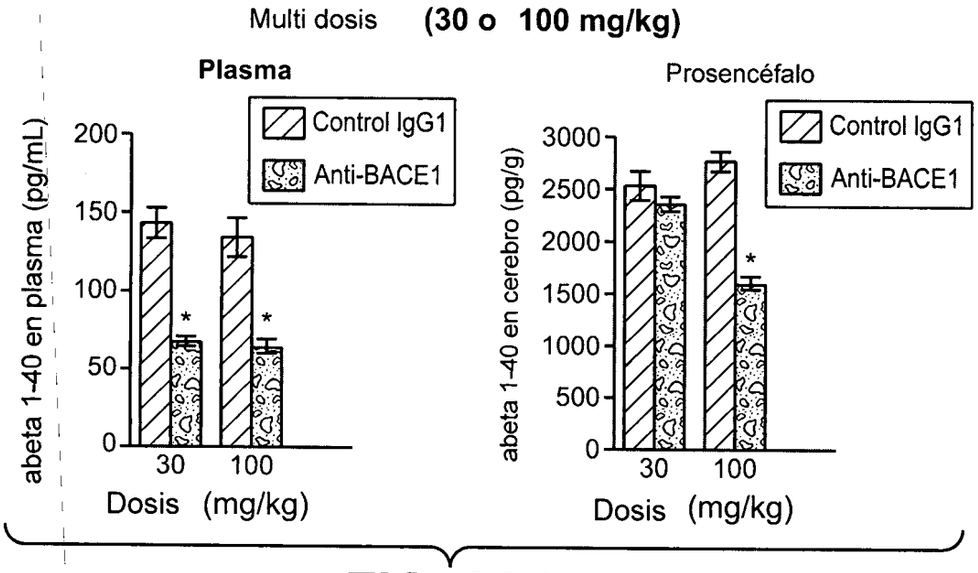


FIG. 22B

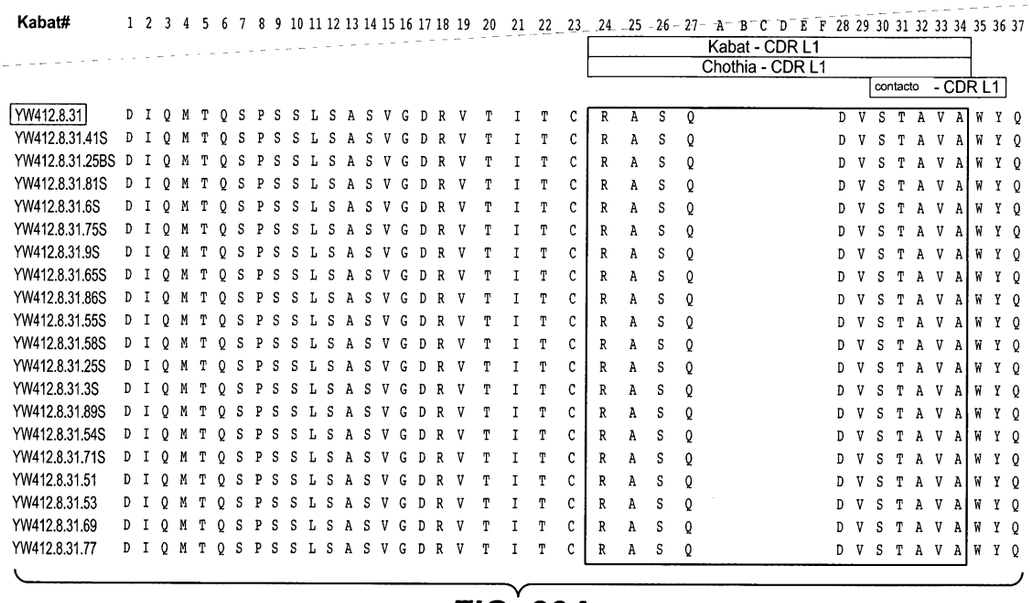

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
contacto - CDR L1
YW412.8.31 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.41S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.25BS D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.81S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.6S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.75S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.9S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.65S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.86S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.55S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.58S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.25S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.3S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.89S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.54S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.71S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.51 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.53 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.69 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q
YW412.8.31.77 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q

FIG. 23A

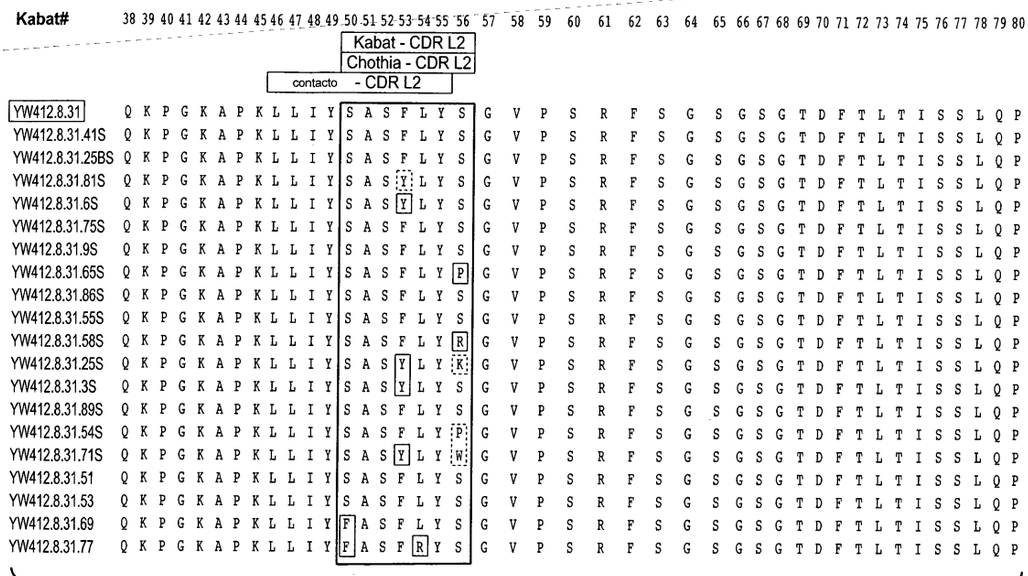

Kabat#
38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
contacto
- CDR L2
YW412.8.31 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.41S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.25BS Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.81S Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.6S Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.75S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.9S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.65S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y P G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.86S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.55S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.58S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y R G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.25S Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y K G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.3S Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.89S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.54S Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y P G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.71S Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y W G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.51 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.53 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.69 Q K P G K A P K L L I Y F A S F L Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW412.8.31.77 Q K P G K A P K L L I Y F A S F R Y S G V P S R F S G S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

FIG. 23B

Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
									Kabat - CDR L3																				
									Chothia - CDR L3																				
									contacto - CDR L3																				
YW412.8.31	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:2)
YW412.8.31.41S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:99)
YW412.8.31.25BS	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:100)
YW412.8.31.81S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:101)
YW412.8.31.6S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:102)
YW412.8.31.75S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	Q	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:103)
YW412.8.31.9S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:104)
YW412.8.31.65S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:105)
YW412.8.31.86S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	S	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:106)
YW412.8.31.55S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	K	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:107)
YW412.8.31.58S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	K	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:108)
YW412.8.31.25S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	Q	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:109)
YW412.8.31.3S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:110)
YW412.8.31.89S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	S	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:111)
YW412.8.31.54S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	S	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:112)
YW412.8.31.71S	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	K	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:113)
YW412.8.31.51	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:114)
YW412.8.31.53	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:115)
YW412.8.31.69	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:116)
YW412.8.31.77	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	P	T	Y	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEC. ID NO:117)

FIG. 23C

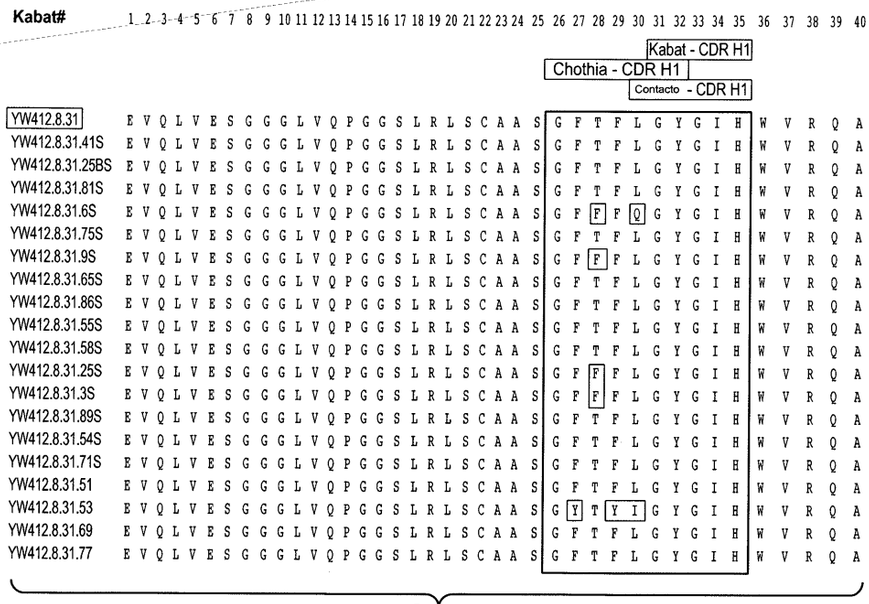

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
YW412.8.31 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.41S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.25BS E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.81S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.6S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F F Q G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.75S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.9S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.65S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.86S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.55S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.58S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.25S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.3S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.89S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.54S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.71S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.51 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.53 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T Y I G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.69 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.31.77 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A

FIG. 24A

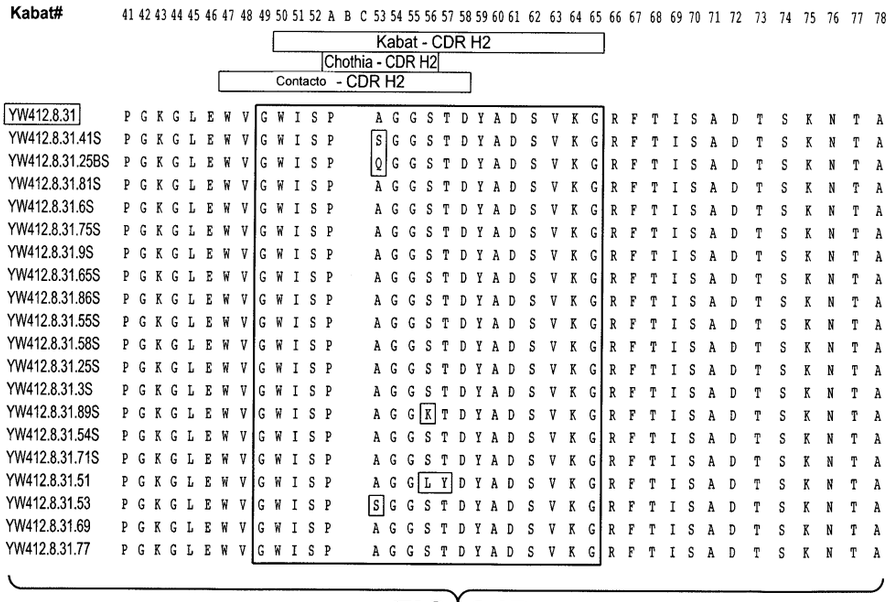

Kabat#
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto - CDR H2
YW412.8.31 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.41S P G K G L E W V G W I S P S G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.25BS P G K G L E W V G W I S P Q G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.81S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.6S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.75S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.9S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.65S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.86S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.55S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.58S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.25S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.3S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.89S P G K G L E W V G W I S P A G G K T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.54S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.71S P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.51 P G K G L E W V G W I S P A G G L Y D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.53 P G K G L E W V G W I S P S G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.69 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31.77 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A

FIG. 24B

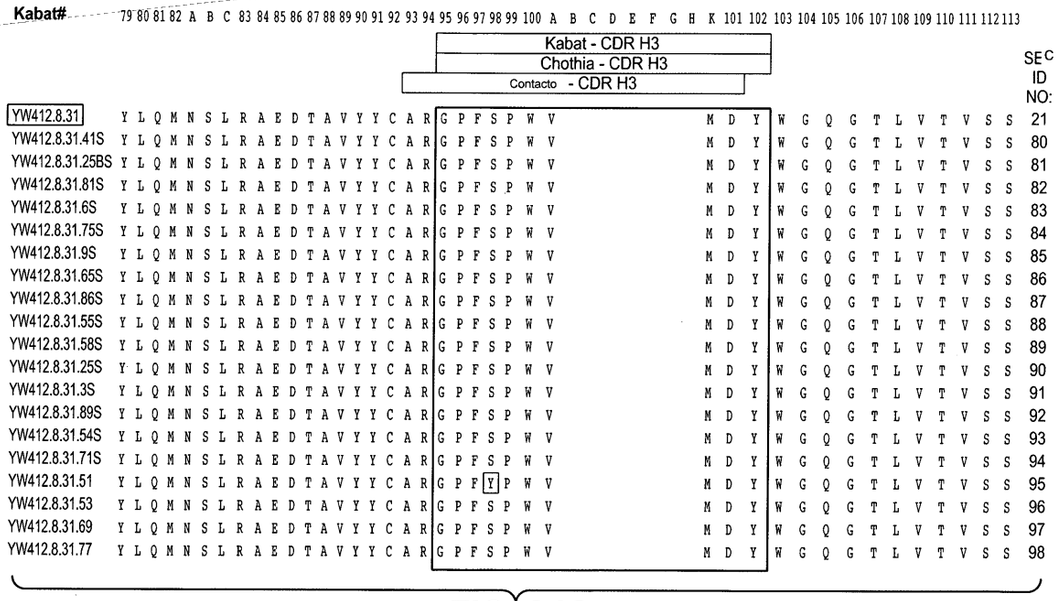

Kabat#
79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
SEQ ID NO:
YW412.8.31 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 21
YW412.8.31.41S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 80
YW412.8.31.25BS Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 81
YW412.8.31.81S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 82
YW412.8.31.6S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 83
YW412.8.31.75S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 84
YW412.8.31.9S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 85
YW412.8.31.65S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 86
YW412.8.31.86S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 87
YW412.8.31.55S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 88
YW412.8.31.58S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 89
YW412.8.31.25S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 90
YW412.8.31.3S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 91
YW412.8.31.89S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 92
YW412.8.31.54S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 93
YW412.8.31.71S Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 94
YW412.8.31.51 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F Y P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 95
YW412.8.31.53 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 96
YW412.8.31.69 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 97
YW412.8.31.77 Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 98

FIG. 24C

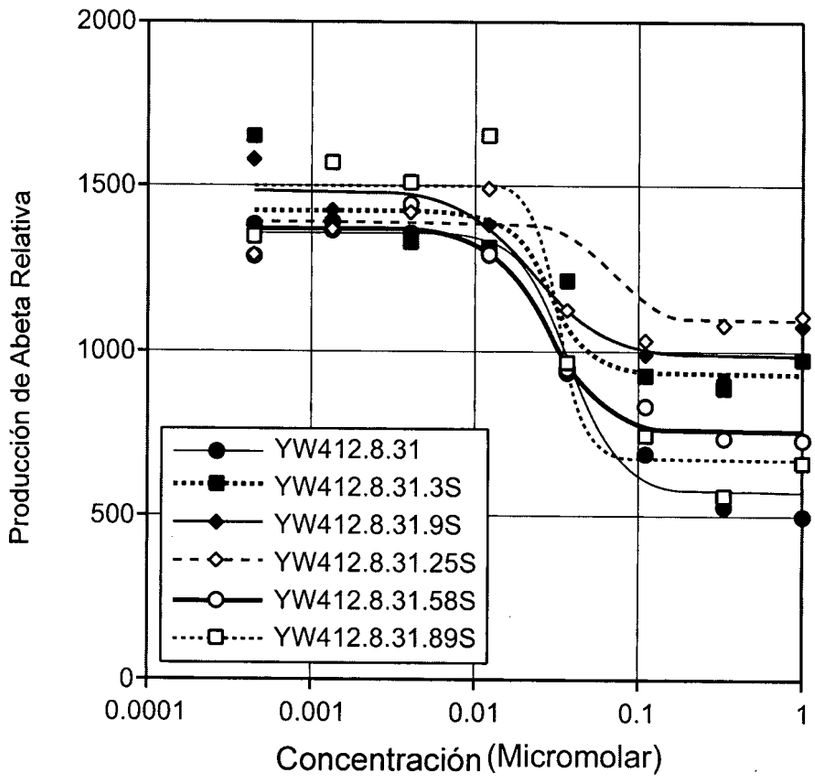

2000
1500
1000
500
0
Producción de Abeta Relativa
YW412.8.31
YW412.8.31.3S
YW412.8.31.9S
YW412.8.31.25S
YW412.8.31.58S
YW412.8.31.89S
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
Concentración (Micromolar)

FIG. 25A

Clones **YW412.8.31 AM**

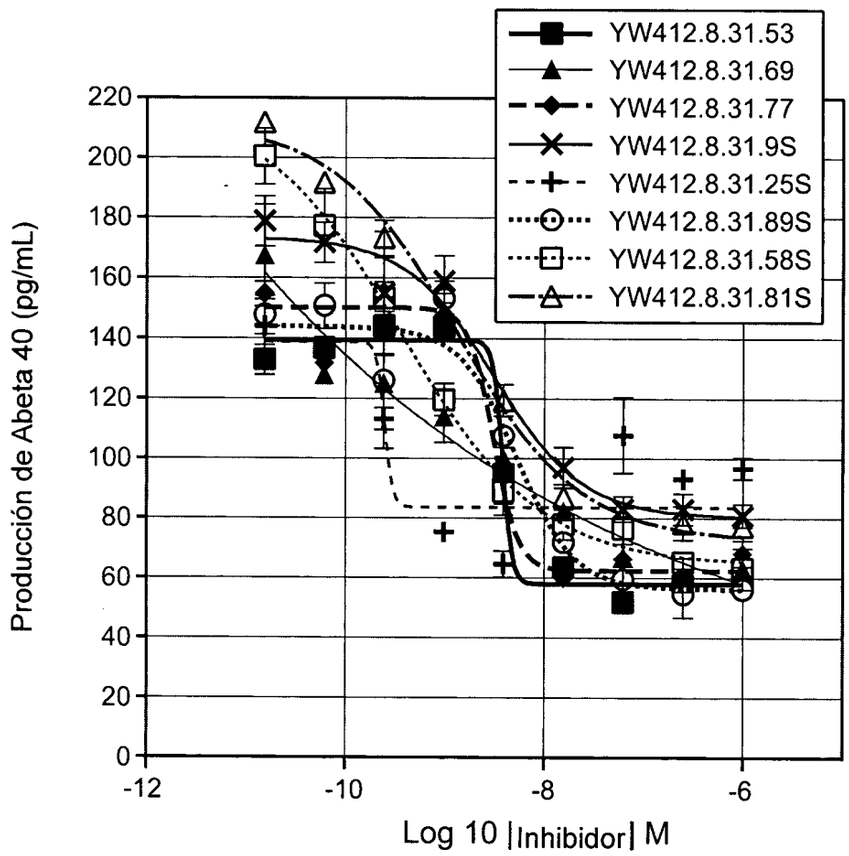


FIG. 25B

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**,, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

TO:JULIE A. HEIDER COMPANY DNA WAY

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JANUARY 11, 2011

PTAS

JULIE A. HEIDER
1 DNA WAY
MS49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

501401318

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 01/10/2011

REEL/FRAME: 025609/0190
NUMBER OF PAGES: 17

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: PR4453

ASSIGNOR:
ATWAL, JASVINDER — DOC DATE: 12/16/2010

ASSIGNOR:
CHEN, YONGMEI — DOC DATE: 12/15/2010

ASSIGNOR:
CHIU, CECILIA PUI CHI — DOC DATE: 12/15/2010

ASSIGNOR:
LAZARUS, ROBERT A. — DOC DATE: 12/16/2010

ASSIGNOR:
WANG, WEIRU — DOC DATE: 12/15/2010

TO:JULIE A. HEIDER COMPANY.. DNA WAY

025609/0190 PAGE 2

ASSIGNOR:
WATTS, RYAN J. DOC DATE: 12/16/2010

ASSIGNOR:
WU, YAN DOC DATE: 01/03/2011

ASSIGNOR:
ZHANG, YINGNAN DOC DATE: 12/16/2010

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61456642 FILING DATE: 11/10/2010
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

OCRUSER, EXAMINER
ASSIGNMENT SERVICES BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1



SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Jasvinder Atwal	12/16/2010
Yongmei Chen	12/15/2010
Cecilia Pui Chi Chiu	12/15/2010
Robert A. Lazarus	12/16/2010
Weiru Wang	12/15/2010
Ryan J. Watts	12/16/2010
Yan Wu	01/03/2011
Yingnan Zhang	12/16/2010

RECEIVING PARTY DATA

Name:	GENENTECH, INC.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61456642

CH $40.00 61456642

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650-467-7743
Email: johnson.ann@gene.com
Correspondent Name: Julie A. Heider
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: MS49
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

TO:JULIE A. HEIDER COMPANY . DNA WAY

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4453
NAME OF SUBMITTER:	Julie A. Heider

Total Attachments: 15
source=PR4453Assignment#page1.tif
source=PR4453Assignment#page2.tif
source=PR4453Assignment#page3.tif
source=PR4453Assignment#page4.tif
source=PR4453Assignment#page5.tif
source=PR4453Assignment#page6.tif
source=PR4453Assignment#page7.tif
source=PR4453Assignment#page8.tif
source=PR4453Assignment#page9.tif
source=PR4453Assignment#page10.tif
source=PR4453Assignment#page11.tif
source=PR4453Assignment#page12.tif
source=PR4453Assignment#page13.tif
source=PR4453Assignment#page14.tif
source=PR4453Assignment#page15.tif

Attorney Docket No. PR4453

ASSIGNMENT

WHEREAS, Jasvinder Atwal, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yongmei Chen, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Cecilia Pui Chi Chiu, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Robert A. Lazarus, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Weiru Wang, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan J. Watts, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yan Wu, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yingnan Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

for which a provisional application Serial No. 61/456,642 (Docket No. PR4453) has been filed by them on November 10, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or

desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

12/16/2010 — Jasvinder Atwal

Date — Name: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Date — Name: Yongmei Chen

South San Francisco

Date — Name: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Date — Name: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Date

Name: Weiru Wang

South San Francisco

12/16/10
Date

Name: Ryan J. Watts

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

South San Francisco

Date

Name: Yingnan Zhang

Attorney Docket No. PR4453

ASSIGNMENT

WHEREAS, Jasvinder Atwal, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yongmei Chen, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Cecilia Pui Chi Chiu, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Robert A. Lazarus, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Weiru Wang, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan J. Watts, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yan Wu, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yingnan Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

for which a provisional application Serial No. 61/456,642 (Docket No. PR4453) has been filed by them on November 10, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or

desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Date

Name: Jasvinder Atwal

South San Francisco

12/15/2010

Date

Name: Yongmei Chen

South San Francisco

12/15/2010

Date

Name: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Date

Name: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Date

Name: Weiru Wang

South San Francisco

Date

Name: Ryan J. Watts

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

South San Francisco

Date

Name: Yingnan Zhang

Attorney Docket No. PR4453

ASSIGNMENT

WHEREAS, Jasvinder Atwal, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yongmei Chen, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Cecilia Pui Chi Chiu, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Robert A. Lazarus, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Weiru Wang, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan J. Watts, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yan Wu, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yingnan Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

for which a provisional application Serial No. 61/456,642 (Docket No. PR4453) has been filed by them on November 10, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or

desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

_____ Date

_____ Name: Jasvinder Atwal

South San Francisco

_____ Date

_____ Name: Yongmei Chen

South San Francisco

_____ Date

_____ Name: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

12/16/10 Date

Robert A. Lazarus Name: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Date

Name: Weiru Wang

South San Francisco

Date

Name: Ryan J. Watts

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

South San Francisco

12/16/2010

Date

Name: Yingnan Zhang

Attorney Docket No. PR4453

ASSIGNMENT

WHEREAS, Jasvinder Atwal, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yongmei Chen, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Cecilia Pui Chi Chiu, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Robert A. Lazarus, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Weiru Wang, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan J. Watts, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yan Wu, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yingnan Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

for which a provisional application Serial No. 61/456,642 (Docket No. PR4453) has been filed by them on November 10, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or

South San Francisco

12/15/2010

Date

Name: Weiru Wang

South San Francisco

Date

Name: Ryan J. Watts

South San Francisco

Date

Name: Yan Wu

South San Francisco

Date

Name: Yingnan Zhang

Attorney Docket No. PR4453

ASSIGNMENT

WHEREAS, Jasvinder Atwal, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yongmei Chen, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Cecilia Pui Chi Chiu, a citizen of Canada, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Robert A. Lazarus, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Weiru Wang, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Ryan J. Watts, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yan Wu, a citizen of the USA, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, and Yingnan Zhang, a citizen of China, having a mailing address of 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

METHODS AND COMPOSITIONS FOR NEURAL DISEASE IMMUNOTHERAPY

for which a provisional application Serial No. 61/456,642 (Docket No. PR4453) has been filed by them on November 10, 2010; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or

desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

_____ _____

Date Name: Jasvinder Atwal

South San Francisco

_____ _____

Date Name: Yongmei Chen

South San Francisco

_____ _____

Date Name: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

_____ _____

Date Name: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Date

Name: Weiru Wang

South San Francisco

Date

Name: Ryan J. Watts

South San Francisco

1/3/2011

Date

Name: Yan Wu

South San Francisco

Date

Name: Yingnan Zhang

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A **GENENTECH, INC.**, firmado por los cedentes y el cesionario.

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES ESTADOS UNIDOS
Bajo el Secretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Enero 11, 2011

PTAS

JULIE A. HEIDER
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos. Una copia microfilmada completa se encuentra disponible en la Sala de Búsquedas de Cesiones en el rollo y cuadro cuyo nombre de referencia aparece más adelante.

Por favor revise toda la información que contiene esta notificación. La información contenida refleja los datos presentes en el Sistema de Cesiones de Marcas y Patentes. Si encuentra errores o tiene preguntas con respecto a este documento, puede contactar al funcionario cuyo nombre aparece en esta notificación, marcando el 571-272-3350. Las solicitudes de corrección se pueden enviar a: U.S. Patent and Trademark Office, Mail Stop: Assignment Services Branch, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313.

Fecha de Registro: 01/10/2011

Rollo/Cuadro: 025609/0190
Número de páginas: 17

Resumen: Cesión de interés del cedente (véase documento para detalles)
Número de Expediente de Abogado: PR4453

Cedente: ATWAL, JASVINDER	Fecha del documento: 12/16/2010
Cedente: CHEN, YONGMEI	Fecha del documento: 12/15/2010
Cedente: CHIU, CECILIA PUI CHI	Fecha del documento: 12/15/2010
Cedente: LAZARUS, ROBERT A.	Fecha del documento: 12/16/2010
Cedente: WANG, WEIRU	Fecha del documento: 12/15/2010
Cedente: WATTS, RYAN J.	Fecha del documento: 12/16/2010
Cedente: WU, YAN	Fecha del documento: 01/03/2011
Cedente: ZHANG, YINGNAN	Fecha del documento: 12/16/2010

Cesionario:
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Número de solicitud: 61456642
Número de patente:

Fecha de presentación: 01/10/2010
Fecha de expedición:

Título: MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

Ocruser, Examinador
SUCURSAL DE SERVICIOS DE CESIONES
DIVISIÓN DE REGISTROS PÚBLICOS

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Jasvinder Atwal	12/16/2010
Yongmei Chen	12/15/2010
Cecilia Pui Chi Chiu	12/15/2010
Robert A. Lazarus	12/16/2010
Weiru Wang	12/15/2010
Ryan J. Watts	12/16/2010
Yan Wu	01/03/2011
Yingnan Zhang	12/16/2010

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIEDADES Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	61456642

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650) 952 9881

Teléfono: 650 467 7743

Correo electrónico: esthere@gene.com

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Nombre del destinatario: Julie A. Heider

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 2: MS#49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR4453
NOMBRE DEL REMITENTE:	Julie A. Heider

Total anexos: 15

Fuente= PR4453Assignment#page1.tif
Fuente= PR4453Assignment#page2.tif
Fuente= PR4453Assignment#page3.tif
Fuente= PR4453Assignment#page4.tif
Fuente= PR4453Assignment#page5.tif
Fuente= PR4453Assignment#page6.tif
Fuente= PR4453Assignment#page7.tif
Fuente= PR4453Assignment#page8.tif
Fuente= PR4453Assignment#page9.tif
Fuente= PR4453Assignment#page10.tif
Fuente= PR4453Assignment#page11.tif
Fuente= PR4453Assignment#page12.tif
Fuente= PR4453Assignment#page13.tif
Fuente= PR4453Assignment#page14.tif
Fuente= PR4453Assignment#page15.tif

Expediente de Abogado No. PR4453

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Jasvinder Atwal**, un ciudadano de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yongmei Chen,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Cecilia Pui Chi Chiu**, una ciudadana de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Robert A. Lazarus**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Weiru Wang,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan J. Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yan Wu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yingnan Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; han inventado una invención nueva y útil en

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/456,642 (Expediente de abogado No. PR4453) el 10 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: 12/16/2010 _____(firma)_____
Nombre: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Yongmei Chen

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Weiru Wang

South San Francisco

Fecha: 12/16/10 _____(firma)_____
Nombre: Ryan J. Watts

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Yan Wu

South San Francisco

Fecha: _____
Nombre: Yingnan Zhang

Expediente de Abogado No. PR4453

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Jasvinder Atwal**, un ciudadano de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yongmei Chen,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Cecilia Pui Chi Chiu**, una ciudadana de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Robert A. Lazarus**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Weiru Wang,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan J. Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yan Wu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yingnan Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; han inventado una invención nueva y útil en

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/456,642 (Expediente de abogado No. PR4453) el 10 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Fecha: 12/15/2010 _____(firma)_____ Nombre: Yongmei Chen

South San Francisco

Fecha: 12/15/2010 _____(firma)_____ Nombre: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Weiru Wang

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Ryan J. Watts

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yan Wu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yingnan Zhang

Expediente de Abogado No. PR4453

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Jasvinder Atwal**, un ciudadano de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yongmei Chen,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Cecilia Pui Chi Chiu**, una ciudadana de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Robert A. Lazarus**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Weiru Wang,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan J. Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yan Wu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yingnan Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; han inventado una invención nueva y útil en

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/456,642 (Expediente de abogado No. PR4453) el 10 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yongmei Chen

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Fecha: 12/16/10 (firma) Nombre: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Weiru Wang

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Ryan J. Watts

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yan Wu

South San Francisco

Fecha: 12/16/2010 (firma) Nombre: Yingnan Zhang

Expediente de Abogado No. PR4453

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Jasvinder Atwal**, un ciudadano de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yongmei Chen,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Cecilia Pui Chi Chiu**, una ciudadana de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Robert A. Lazarus**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Weiru Wang,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan J. Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yan Wu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yingnan Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; han inventado una invención nueva y útil en

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/456,642 (Expediente de abogado No. PR4453) el 10 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yongmei Chen

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Fecha: 12/15/2010 _____(firma)_____ Nombre: Weiru Wang

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Ryan J. Watts

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yan Wu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yingnan Zhang

Expediente de Abogado No. PR4453

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, **Jasvinder Atwal**, un ciudadano de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yongmei Chen,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Cecilia Pui Chi Chiu**, una ciudadana de Canadá, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Robert A. Lazarus**, un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Weiru Wang,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Ryan J. Watts,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; **Yan Wu,** un ciudadano de Estados Unidos, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; y **Yingnan Zhang**, un ciudadano de China, con dirección de correspondencia 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080; han inventado una invención nueva y útil en

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INMUNOTERAPIA PARA ENFERMEDAD NEURAL

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serial No. 61/456,642 (Expediente de abogado No. PR4453) el 10 de noviembre de 2010; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de Paris para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., el disfrute hasta su máxima extensión del derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucran dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucran dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Jasvinder Atwal

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yongmei Chen

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Cecilia Pui Chi Chiu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Robert A. Lazarus

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Weiru Wang

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Ryan J. Watts

South San Francisco

Fecha: 01/03/2011 (firma) Nombre: Yan Wu

South San Francisco

Fecha: _____ Nombre: Yingnan Zhang

AS. 124.453316

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0024256

Bogotá D.C., Marzo 12 de 2013 - 08:08:10

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513500	11/03/2013	35.620.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

317

AD-124-453

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0033559

Bogotá D.C., Abril 10 de 2013 - 16:38:11

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	492506206	10/04/2013	37.342.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
20	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	600.000.00
				$600.000.00

SON: **SEISCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

AD. 124.4V3318

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0027243

Bogotá D.C., Marzo 19 de 2013 - 07:46:09

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513474	18/03/2013	24.248.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
20 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	600.000.00
			$600.000.00

SON: **SEISCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106882- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

AS. 124.453 399

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0024271

Bogotá D.C., Marzo 12 de 2013 - 08:08:10

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513500	11/03/2013	35.620.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
20	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	600.000.00
				$600.000.00

SON: **SEISCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

320

AS. 12443

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 003582

Bogotá D.C., Enero 14 de 2013 - 17:10:58

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446244901	14/01/2013	34.942.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
3	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	90.000.00
				$90.000.00

SON: **NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

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

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-106682- -00000-0000
Fecha: 2013-04-26 16:08:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 320