



BT



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

**08-55471**

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO “ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO  
AB, PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ÉSTOS,  
HYBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS  
NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED,  
MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS  
ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE  
COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE  
DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR  
DICHOS ANTICUERPOS”

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/18; A61K 38/04

71. SOLICITANTE ABBOTT LABORATORIES Y ABBOTT  
GMBH & CO. KG

DOMICILIO ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS,  
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA Y WIESBADEN,  
ALEMANIA

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

22. BOGOTÁ, D.C.

30 MAY 2008

# PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055471 - 00000-0000

Fecha: 2008-05-30 18:07:23 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYW Eva 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

## FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

30 Jun 2008

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1 SOLICITUD DE:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I. <input type="checkbox"/> Capítulo II.                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>2 SOLICITANTE</b><br>(71)                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Nombre: <b>ABBOTT LABORATORIES Y ABBOTT GMBH &amp; CO. KG</b><br><br>Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América y Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden, Alemania.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América y Wiesbaden, Alemania.<br><br>Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América y Alemania.<br><br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jlloco@lloredacamacho.com |                                                             | <b>IDENTIFICACION</b><br><br>C.C. <input type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br><br>Cual _____<br>Número _____            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Nombre: <b>ALICIA LLOREDA RICAURTE</b><br><br>Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia<br><br>Teléfono: 3264270 Fax: 6069701<br>E-mail: jlloco@lloredacamacho.com                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             | C.C. <input checked="" type="checkbox"/> NIT <input type="checkbox"/><br>C.E. <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/><br><br>Cual _____<br>Número <u>39.690.713</u> TP <u>53.215</u> |
| <b>3 REPRESENTANTE O APODERADO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Nombre: <b>BARGHORN, Stefan; EBERT, Ulrich; HILLEN, Heinz; KELLER, Patrick; STRIEBINGER, Andreas y LABKOVSKY, Boris.</b><br><br>Dirección: Berliner Str. 30, 68161 Mannheim; Königstuhlstr. 6, 68163 Mannheim; Max-Planck-Str. 17, 67454 Hassloch, Bernhardstr. 30, 64291 Darmstadt; Ziegelofenweg 46A, 67346 Speyer y 115 Union Road, P.O.Box 7, Wales, MA 01801.<br><br>Nacionalidad o Domicilio: Alemania y Estados Unidos de América.                                                    |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>4 INVENTOR(ES)</b><br>(72)                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>5 PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2006/011530</u> Fecha: <u>30/11/06</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO 2007/062852 A3</u> Fecha: <u>07/06/07</u>                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>6 Título (54)</b> "ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO AB, PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ESTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS" |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>7 Clasificación Internacional (51)</b> <u>C07K 16/18; A61K 38/04</u>                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>8 Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                | <b>(33) País de Origen</b><br>US US<br>US US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>(32) Fecha</b><br>30/11/05 03/03/06<br>30/03/06 05/09/06 | <b>(31) Número de Solicitud</b><br>60/740,866 60/779,171<br>60/787,361 60/842,400                                                                                                                   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |
| <b>9 Comprobante de Pago No.</b> <u>08-33,097</u> <b>Fecha:</b> <u>24 de Abril de 2008</u>                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                             |                                                                                                                                                                                                     |

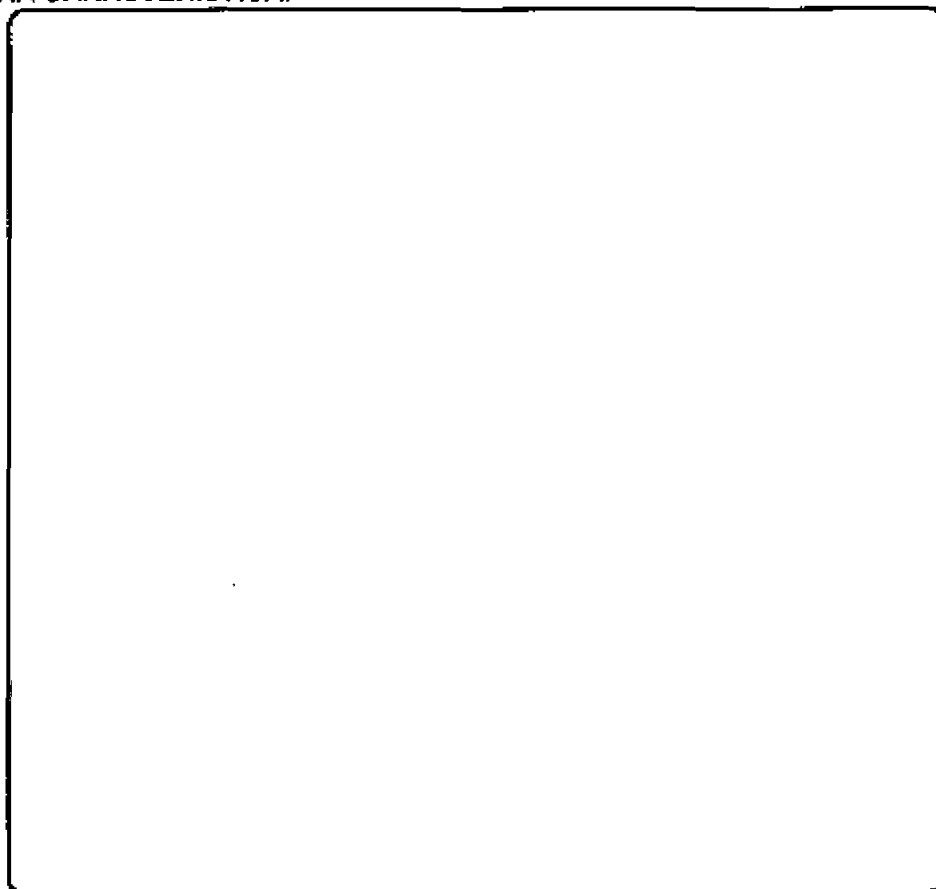
10

## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción y listado de secuencias.

11

## FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLÓREDA RICAURTE

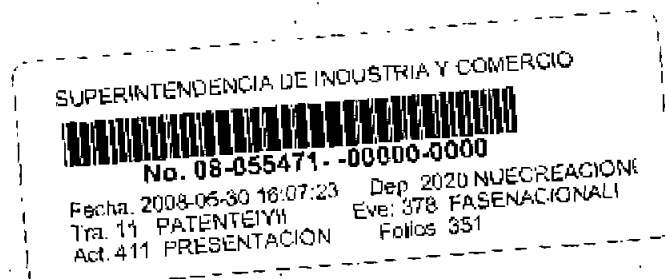
FIRMA:

*Alicia Lloreda Ricaurte*

C.C. 39.690.713

T.P. 59.215

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 33,697  
FECHA : ABRIL 24 DE 2008

==== CONSIGNACION ====

| DEPOSITANTE         | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|---------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| ILLOREDA Y CIA S. A | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 773640   | 24/04/2008 | 5,991,000.00 |

==== CONCEPTO ====

| CANT. AERISTICO           | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 501,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | \$ 501,000.00  |

SOM: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_



## ANEXO

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

  
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

**TRADUCCION OFICIAL No. 2004-07-29-362**  
**DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES**

---

**PODER**

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español, dado y firmado el 12 de julio de 2004.

(firma: ilegible)

Laura J. Schumacher

Vicepresidente, Secretaria y Asesora General Suplente

Certificado Notarial (Sociedad), documento escrito en inglés y en español.

(firma: ilegible)

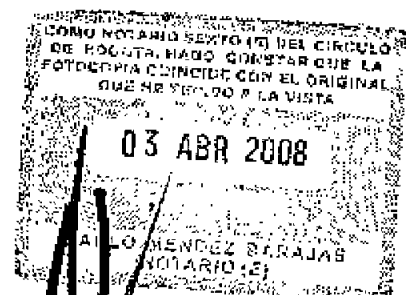
Notario Público

Sello Oficial

Trina Lee Ruiz

Notario Público, Estado de Illinois

Mi Comisión Expira el 6-11-2007



**Estado de Illinois**  
**Secretario de Estado**  
**APOSTILLA**

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

1. Pais: Estados Unidos de América  
Este documento público
2. ha sido firmado por Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

**Certificado**

5. en Springfield, Illinois
6. el 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
10. Firma: ilegible

Sello del Estado de Illinois

Jesse White

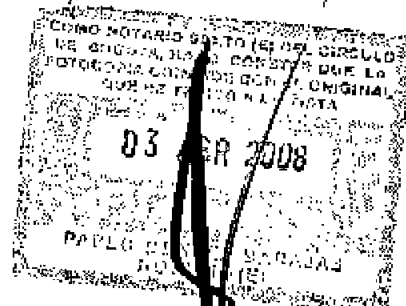
Secretario de Estado

Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 29 de julio de 2004,  
en la ciudad de Bogotá, D.C. por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial,  
Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia

TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

*Anita Escobar de Tamayo*  
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



901545045  
10/07/2008 12:12:10

RECEPCION  
10/07/2008 12:12:10

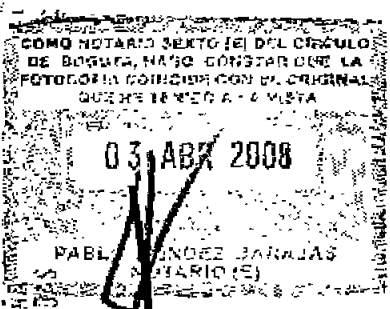
10/07/2008 12:12:10

Amity Escobar

mes

DE LAS ORGANIZACIONES

QUIA FOMENTA LA PARTICIPACION  
DE LOS CIUDADANOS EN LA  
GOBERNANCIA LOCAL



Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

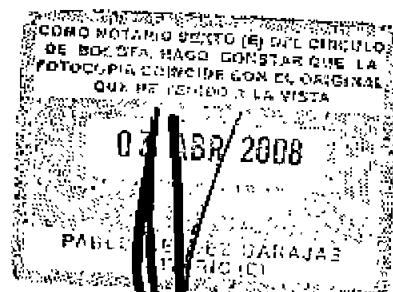
con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

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

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

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

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004



The undersigned, **ABBOTT LABORATORIES**, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

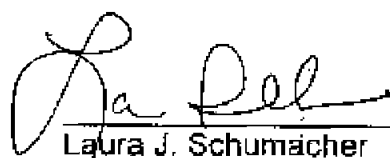
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

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

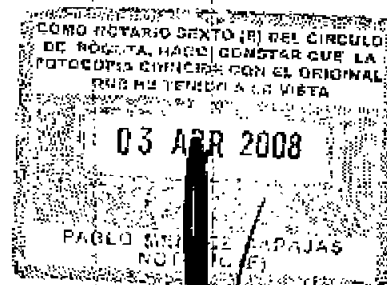
Doctors **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for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

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

Given and signed this 12<sup>th</sup> day of July, 2004



Laura J. Schumacher  
Vice President, Secretary and Deputy General  
Counsel





**SPRINGFIELD, ILLINOIS**

**APOSTILLE**

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America  
This public document
2. has been signed by TRINA LEE RUIZ
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois
6. JULY 20, 2004
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. S04VB11001
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



*Jesse White*

JESSE WHITE  
SECRETARY OF STATE  
STATE OF ILLINOIS



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América  
Estado de {ss  
Condado de  
Hoy 12 de Julio de 2004, compareció  
Laura J. Schumacher a quien conozco y  
de quien me consta que firmó el anterior documento,  
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que  
él es Vice Presidenta, Secretaria y Asesora  
de ABBOTT

LABORATORIES, la compañía nombrada en el  
documento que antecede, una sociedad  
debidamente organizada y existente conforme a las  
leyes del Estado de Illinois, Estados  
Unidos de América, domiciliada en la ciudad de  
Abbott Park, Condado de Lake  
Estado de Illinois, Estados Unidos de  
América, legalmente constituida para un período de  
duración que aún no ha terminado, que ejerce su  
objeto social conforme a las leyes del Estado de  
Illinois, Estados Unidos de América;  
que el declarante está autorizado por dicha  
Compañía para conferir este poder; que el sello  
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en  
representación de la expresada Compañía, es el  
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se  
confiere este instrumento está comprendido dentro  
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de  
incorporación firmados en Chicago  
Estado de Illinois, con fecha Sep. 12, 2003,  
y certifica que de conformidad con la legislación de  
dicho Estado la anterior declaración juramentada es  
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella  
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

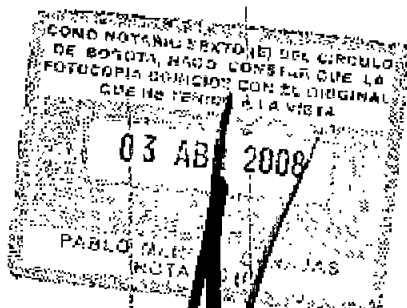
United States of America  
State of {ss  
County of  
On this 12th day of July 2004  
personally  
came  
to me known, and known to me to be the person who  
signed the foregoing instrument, who being by me  
duly sworn did depose and say that she is the Vice President  
Secretary and Deputy  
General Counsel of ABBOTT

LABORATORIES, the company named within, a  
Corporation organized and existing under the laws of  
the State of Illinois, United  
States of America, domiciled at the City of Abbott Park  
County of Lake

State of Illinois, United States of America,  
legally constituted for a period of tenure not yet  
expired, which exercises its corporate purposes  
according to the laws of the State of Illinois,  
United States of America; that the deponent is  
authorized by said Company to confer this power of  
attorney; that the seal affixed hereunto by the  
deponent in the name and on behalf of said  
Corporation is the corporate seal thereof; and that the  
purpose for which this instrument is granted is  
included within the corporate purposes of the  
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles  
of Incorporation of said Corporation executed at  
Chicago, State of Illinois, under date of  
September 12, 2003, and hereby  
certifies that under the laws of said State the  
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the  
facts therein contained are true, which he attests.

*Trina Lee Ruiz*





TRADUCCION OFICIAL No. 2004-10-21-542  
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

---

PODER

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

Certificado Notarial (Sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

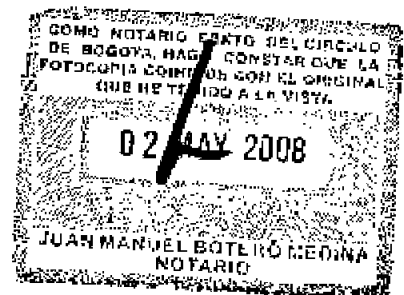
U.R. Nr. 2480/2004

Yo, Alfred Kluge, Notario Público en Ludwigshafen/Rhine, República Federal de Alemania, mediante el presente certifico y confirmo que las firmas que aparecen anteriormente de

1. Señor Andreas M. **Dankers**, Asesor Legal Senior en Ludwigshafen/Rhine, a quien conozco personalmente,
2. Señora Susanne **Zimmermann**, Asesora Legal en Ludwigshafen/Rhine, a quien conozco personalmente,

son fieles y válidas.

Después de verificar hoy un extracto certificado del registro de comercio competente fechado el día 13 de julio de 2004, por el presente confirmo que el



señor Dankers y la señora Zimmermann son directores quienes están autorizados para representar conjuntamente a **Abbott GmbH & Co. KG**, Wiesbaden (Tribunal del Distrito de Wiesbaden/Alemania HR A 4888).

Ludwigshafen/Rhine, este día 26 de agosto de 2004.

(firma: ilegible)

Hay un sello rojo.

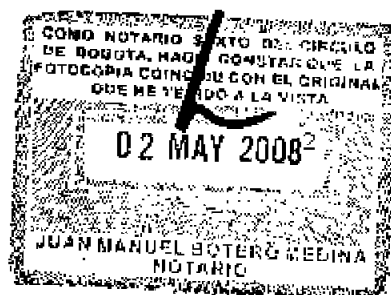
Notario Público

Wer: 10 000, --Euros

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 21 de octubre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL  
RESOLUCION 2177

*Anita Escobar de Tamayo*  
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



TRADUCCION OFICIAL No. 10450

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Arriaga de Herber, resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978.-

Traducción de las apostilla en alemán que se encuentran a continuación del Certificado notarial (sociedad) en español e inglés de la existencia de la sociedad Abbott GmbH & Co KG, domiciliada en Wiesbaden, por el notario de Ludwigshafen am Rhein, Alfred Kluge, que se encuentran a continuación de un documento por medio del cual se otorga poder a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en la Calle 72 No. 5-83, Piso 6, Bogotá, Colombia. Dado y firmado el 26 de agosto 2004 en Ludwigshafen am Rhein, Alemania

**APOSTILLE**

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. Ha sido firmado por el notario Alfred Kluge

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del notario de Ludwigshafen am Rhein, Alfred Kluge

**Certificado**

5. en Frankenthal (Pfalz)

6. el 30 de agosto de 2004

7. por el Presidente del Tribunal Regional

8. bajo el No. 91 Eb – 1138-1140/04

9. Sello

10. Firma

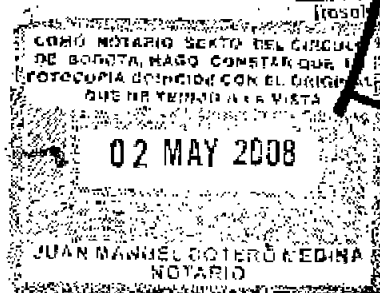
(Hilo y oblea del Tribunal Regional) p.e. Fdo.. firma ilegible

(Christian Könske)

Juez del Tribunal Regional

Costas

Derechos 13,50 €



MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

U 5 6 6 5 6

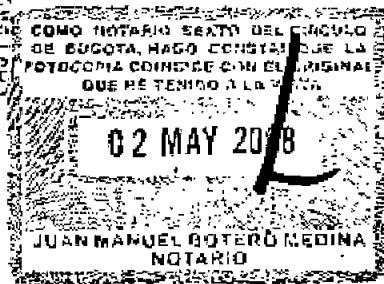
*Reg. Colombia*  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPLEA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

HU SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 OCT 26 P 10:58

*LCS*

JEFE DE LEGALIZACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



Sigue en inglés certificación de la autenticidad de las firmas de los señores Danckers y Zimmermann, representantes legales de Abbott GmbH & Co. KG, domiciliada en Wiesbaden, por el notario de Ludwigshafen am Rhein, Alfred Kluge, bajo el No. 2480/2004 del 26 de agosto 2004.

### APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

9. Pais: República Federal de Alemania

Este documento público

2. Ha sido firmado por el notario Alfred Kluge

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del notario de Ludwigshafen am Rhein, Alfred Kluge

### Certificado

5. en Frankenthal (Pfalz)

6. el 30 de agosto de 2004

7. por el Presidente del Tribunal Regional

8. bajo el No. 91 Eb – 1138-1140/04

9. Sello

10. Firma

(Hilo y oblea del Tribunal Regional) p.e. Fdo.: firma ilegible

(Christian Köneke)

Juez del Tribunal Regional

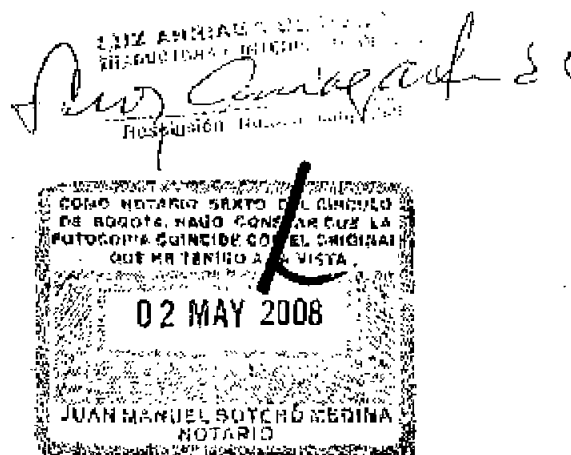
Costas

Derechos 13,50 €

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.-

Bogotá, 21 de octubre 2004

C. 2211



MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

056657

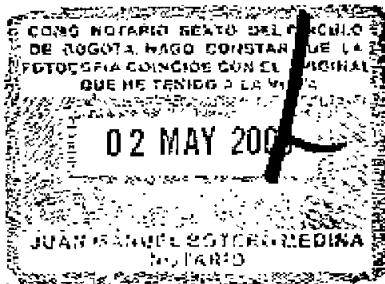
*Luz Ariza*  
Cuya firma aparece en el  
DOCUMENTO DE EMPEÑO  
LAS FUNCIONES INDICADAS

RUZ LAZARKE  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 OCT 26 P 10:59

*Luz*

JEFE DE LEGALIZACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



Los abajo firmados, **ABBOTT GmbH & Co. KG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Alemania.

The undersigned, **ABBOTT GmbH & Co. KG**, a corporation organized and existing under the laws of Germany.

con domicilio en **Max-Planck-Ring 2**  
**65205 Wiesbaden, Alemania.**

domiciled at **Max-Planck-Ring 2**  
**65205 Wiesbaden, Germany.**

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

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

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

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

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

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

Dado y firmado

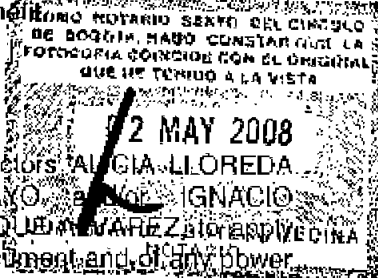
Given and signed this **26. Aug. 2004**

**ABBOTT GmbH & Co. KG**

Name: **ppa. Danckers ppa. Zimmermann**

Title: **Senior Authorized Officers**

**NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE**



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Wiesbaden

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de ABBOTT GmbH & Co. KG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Alemania, domiciliada en la ciudad de Wiesbaden, Alemania; legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Alemania, que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Wiesbaden

Ludwigshafen

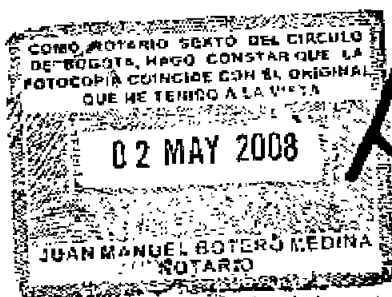
{ss

On this 26<sup>th</sup> day of August 2004 personally Andreas M. Danckers and Susanne Zin cameto Knollstr., 67061 Ludwigshafen/ man to me known, and known to me to be the persons who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that they are both directors of ABBOTT GmbH & Co. KG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Germany, domiciled at the City of Wiesbaden, Germany; legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Germany, that the deponents are authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. The undersigned Notary Public has seen a certified a certified copy of the Statutes of said Corporation executed at the register of commerce, under date of 13.7.200 and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Ludwigshafen, this 26<sup>th</sup> day of August, 2004



notary public



NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)



U.R.Nr. 2480/2004

1, Alfred Kluge, notary public at Ludwigshafen/Rhine,  
Federal Republic of Germany, hereby testify and con-  
firm that the foregoing signatures of

1. Mr. Andreas M. **Danckers**, Senior Counsel at  
Ludwigshafen/Rhine, personally known to me,

2. Mrs. Susanne **Zimmermann**, Counsel at  
Ludwigshafen/Rhine, personally known to me,

are true and valid.

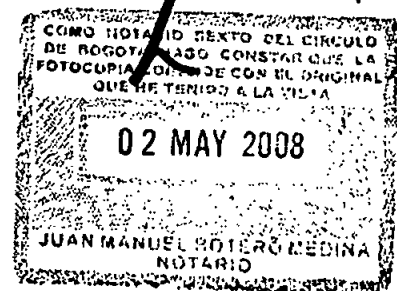
After having checked today a certified extract of the  
competent register of commerce dated 13<sup>th</sup> day of  
July, 2004, I herewith confirm that Mr. Danckers and  
Mrs. Zimmermann are directors who are authorized to  
jointly represent **Abbott GmbH & Co. KG**, Wiesbaden  
(District Court of Wiesbaden/Germany HR A 4888).

Ludwigshafen/Rhine, this 26<sup>th</sup> day of August, 2004



notary public

Wert: 10.000,-- Euro



A P O S T I L L E

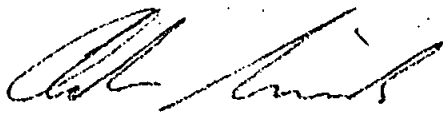
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land : Bundesrepublik Deutschland  
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Notar  
K l u g e
3. in seiner Eigenschaft als  
öffentlicher Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel  
des Notars Alfred Kluge  
in Ludwigshafen am Rhein

Bestätigt

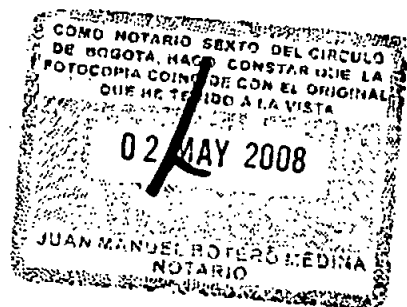
5. in Frankenthal (Pfalz)
6. am 30. August 2004
7. durch den Präsidenten des Landgerichts
8. unter Nr. 91 Eb - 1138-1140/04

9. Siegel/Stempel:
10. Unterschrift  
Im Auftrag



(Christian Köneke)  
Richter am Landgericht

Kostenvermerk:  
Gebühr 13,50 €



A P O S T I L L E

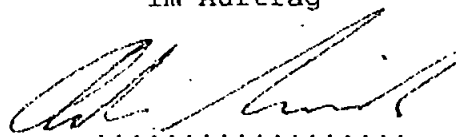
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land : Bundesrepublik Deutschland  
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Notar  
K l u g e
3. in seiner Eigenschaft als  
öffentlicher Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel  
des Notars Alfred Kluge  
in Ludwigshafen am Rhein

Bestätigt

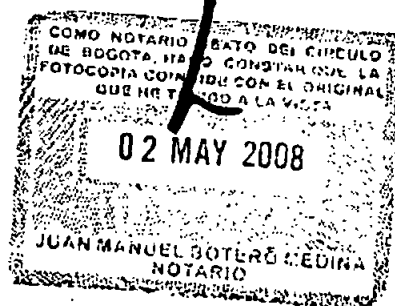
5. in Frankenthal (Pfalz)
6. am 30. August 2004
7. durch den Präsidenten des Landgerichts
8. unter Nr. 91 Eb - 1138-1140/04

9. Siegel/Stempel:
10. Unterschrift  
Im Auftrag



(Christian Köneke)  
Richter am Landgericht

Kostenvermerk:  
Gebühr 13,50 €



NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                    |            |           |                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |            |           | (51) Int Cl: C07K 16/18; A61K 38/04                                                                                          |
| (22) Fecha de solicitud: 30-05-08                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                    |            |           | (71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES Y ABBOTT GMBH & CO. KG                                                              |
| (30) Prioridad                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | (31) No. Prioridad | (32) Fecha | (33) País | (72) Inventor(es): BARGHORN, Stefan; EBERT, Ulrich; HILLEN, Heinz; KELLER, Patrick; STRIEBINGER, Andreas y LABKOVSKY, Boris. |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60/740,866         | 30-11-05   | US        |                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60/779,171         | 03-03-06   | US        |                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60/787,361         | 30-03-06   | US        |                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60/842,400         | 05-09-06   | US        |                                                                                                                              |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional: 30-06-08                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                    |            |           | (87) Publicación internacional                                                                                               |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT                                                                                                                                                                                                                                                                            |                    |            |           | Fecha: 07-06-07                                                                                                              |
| Fecha de presentación de la solicitud: 30-11-06                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                    |            |           | N° publicación: WO 2007/062852 A3                                                                                            |
| No. de solicitud: PCT/EP2006/011530                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                    |            |           |                                                                                                                              |
| (54) Titulo: ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A $\beta$ , PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ÉSTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS |                    |            |           |                                                                                                                              |

Resumen - Reivindicación(es):

**Reivindicación número 1.-**

Anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

**Reivindicación número 65.-**

El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 97-109 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 98-107 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 98-101 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 38, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 38, y los residuos de aminoácidos 98-109 de SEQ ID N° 38.

## REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2006/011530

### Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:  
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:  
porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:  
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

### Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

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

ver hoja adicional

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☒ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:  
1-69, 88-89 (parcialmente), 91-116 (parcialmente)

Comentario sobre Protesta ☐ Las tarifas adicionales de búsqueda estaban acompañadas por la protesta del solicitante.

☐ Ninguna protesta acompañaba el pago de tarifas adicionales de búsqueda.

## INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiple (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. reivindicaciones: 1-69, 88-89 (parcialmente), 91-116 (parcialmente)

Anticuerpos que tienen una afinidad ligante a un globulímero A-beta (20-42) que es mayor que la afinidad ligante del anticuerpo a un globulímero A-beta (1-42), mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

2. reivindicaciones 70-77, 88-89 (parcialmente), 91-116 (parcialmente)

Anticuerpos que comprenden al menos un dominio variable que tiene una secuencia aminoácido seleccionada de los grupos de Seqq- Idd. Nos. 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20, 23-24, 27-28, 31-32, 35-36 y 38, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

3. reivindicaciones 78, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7241, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

4. reivindicaciones 79, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7239, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

5. reivindicaciones 80, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7240, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

6. reivindicaciones 81, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7242, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

7. reivindicaciones 82, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7408, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

8. reivindicaciones 83, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7409, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

9. reivindicaciones 84, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7405, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

10. reivindicaciones 85, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7809, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

11. reivindicaciones 86, 88-116 (parcialmente)

## INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7810, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---

### 12. reivindicaciones 87, 88-116 (parcialmente)

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7851, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

---



# REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2006/011530

## A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

INV. C07K16/18 C07K14/47 A61K38/04

Segun la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

## B. CAMPOS BUSCADOS

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

C07K A61K

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

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

EPO-Internacional, CHEM ABS Dato, BIOSIS, WPI Dato

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría ° | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                                                | Relevante a la reivindicación No. |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| X           | WO 2004/067561 A (ABBOTT GMBH & CO.)<br>12 de Agosto de 2004 (2004-08-12)<br>citado en la solicitud<br>el documento completo                                                                                                                                                                                                        | 1-69, 88,<br>89,<br>91-116        |
| X           | N SERGEANT Y COL.: "Especies truncadas de péptido beta-amiloide en enfermedades pre-Alzheimer como nuevos blancos para la aproximación de vacunación"<br>JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.,<br>vol. 85, Junio de 2003 (2003-06), páginas 1581-1591,<br>XP002257887<br>US NUEVA YORK, NY<br>citado en la solicitud<br>el documento completo | 1-69, 88,<br>89,<br>91-116        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> En el recuadro C se enumeran más documentos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <p>° Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular</p> <p>'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional</p> <p>'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)</p> <p>'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios</p> <p>'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada</p> | <p>'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención</p> <p>'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo</p> <p>'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica</p> <p>'&amp;' documento miembro de la misma familia de patentes</p> |
| <p>Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional</p> <p>27 de Febrero de 2007</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <p>Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional</p> <p>06/06/2007</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p>Nombre y dirección de correo de la ISA/</p> <p>Oficina de Patentes Europea, P.R. 5818 Patentlaan 2</p> <p>NL-2280 NV Rijswijk</p> <p>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,</p> <p>Fax: (+31-70) 340-3016</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <p>Funcionario autorizado</p> <p>Masturzo, Pietro</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

# REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2006/011530

## C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría ° | Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes                                                                                                                                                                                                                               | Relevante a la reivindicación No.      |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P, X        | <p> S BARGHORN Y COL.: "Oligómero 1-42 del péptido beta-amiloide globular - una proteína homogénea y estable en la enfermedad de Alzheimer"</p> <p> JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.,<br/> vol. 95, 2005, páginas 834-847, XP002386548<br/> US NUEVA YORK, NY<br/> citado en la solicitud<br/> el documento completo</p> | <p> 1-69, 88,<br/> 89,<br/> 91-116</p> |
| P, X        | <p> -----</p> <p> WO 2006/094724 A (ABBOTT GMBH &amp; CO.)<br/> 14 de Septiembre de 2006 (2006-09-14)</p> <p> el documento completo</p> <p> -----</p>                                                                                                                                                              | <p> 1-69, 88,<br/> 89,<br/> 91-116</p> |

**REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.  
PCT/EP2006/011530

| Documento de patente citado en el reporte de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|-------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| WO 2004067561 A                                       | 12-08-2004           | AU 2004207075 A1                     | 12-08-2004           |
|                                                       |                      | BR PI0407084 A                       | 24-01-2006           |
|                                                       |                      | CA 2514582 A1                        | 12-08-2004           |
|                                                       |                      | CN 1768076 A                         | 03-05-2006           |
|                                                       |                      | DE 10303974 A1                       | 05-08-2004           |
|                                                       |                      | EP 1594891 A1                        | 16-11-2005           |
|                                                       |                      | KR 20050103483 A                     | 31-10-2005           |
|                                                       |                      | MX PA05007964 A                      | 20-09-2005           |
|                                                       |                      | US 2007098721 A1                     | 03-05-2007           |
| WO 2006094724 A                                       | 14-09-2006           | NINGUNO                              |                      |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2006/011530

## Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-69, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-69, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Antibodies having a binding affinity to an A-beta (20-42) globulomer that is greater than the binding affinity of the antibody to an A-beta (1-42) globulomer, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

---

2. claims: 70-77, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

Antibodies comprising at least a variable domain having an amino acid sequence selected from the groups of Seqq. Idd. nos. 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20,, 23-24; 27-28, 31-32, 35-36 and 38, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

---

3. claims: 78, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7241, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

---

4. claims: 79, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7239, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

---

5. claims: 80, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7240, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

---

6. claims: 81, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7242, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics  
---

7. claims: 82, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7408, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics  
---

8. claims: 83, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7409, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics  
---

9. claims: 84, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7405, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics  
---

10. claims: 85, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7809, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics  
---

11. claims: 86, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7810, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

---

12. claims: 87, 88-116 (partially)

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7851, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/011530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C07K16/18 C07K14/47 A61K38/04

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C07K A61K

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

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No.     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| X         | WO 2004/067561 A (ABBOTT GMBH & CO.)<br>12 August 2004 (2004-08-12)<br>cited in the application<br>the whole document                                                                                                                                                                                           | 1-69,88,<br>89,<br>91-116 |
| X         | N SERGEANT ET AL.: "Truncated<br>beta-amyloid peptide species in<br>pre-Alzheimer diseases as new targets for<br>the vaccination approach"<br>JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.,<br>vol. 85, June 2003 (2003-06), pages<br>1581-1591, XP002257887<br>US NEW YORK, NY<br>cited in the application<br>the whole document | 1-69,88,<br>89,<br>91-116 |

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

☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

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

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2007

Date of mailing of the international search report

06/06/2007

Name and mailing address of the ISA/  
 European Patent Office, P.O. 5818 Patentkan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, Pietro



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/011530

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No.     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| P,X       | S BARGHORN ET AL.: "Globular amyloid beta-peptide 1-42 oligomer - a homogeneous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease"<br>JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY.,<br>vol. 95, 2005, pages 834-847, XP002386548<br>US NEW YORK, NY<br>cited in the application<br>the whole document | 1-69,88,<br>89,<br>91-116 |
| P,X       | WO 2006/094724 A (ABBOTT GMBH & CO.)<br>14 September 2006 (2006-09-14)<br><br>the whole document                                                                                                                                                                                              | 1-69,88,<br>89,<br>91-116 |

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/011530

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2004067561 A                           | 12-08-2004          | AU 2004207075 A1           | 12-08-2004          |
|                                           |                     | BR PI0407084 A             | 24-01-2006          |
|                                           |                     | CA 2514582 A1              | 12-08-2004          |
|                                           |                     | CN 1768076 A               | 03-05-2006          |
|                                           |                     | DE 10303974 A1             | 05-08-2004          |
|                                           |                     | EP 1594891 A1              | 16-11-2005          |
|                                           |                     | KR 20050103483 A           | 31-10-2005          |
|                                           |                     | MX PA05007964 A            | 20-09-2005          |
|                                           |                     | US 2007098721 A1           | 03-05-2007          |
| WO 2006094724 A                           | 14-09-2006          | NONE                       |                     |

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual  
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional  
7 de Junio de 2007 (07.06.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2007/062852 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/04 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)

(74) Agente: REITSTÖTTER-KINZEBACH; Reitstötter,  
Kinzebach & Partner (GbR), Sternwartstrasse 4, 81679  
München (DE).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2006/011530

(22) Fecha de Registro Internacional:

30 de Noviembre de 2006 (30.11.2006)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(30) Información de Prioridad:

60/740,866 30 de Noviembre de 2005 (30.11.2005) US  
60/779,171 3 de Marzo de 2006 (03.03.2006) US  
60/787,361 30 de Marzo de 2006 (30.03.2006) US  
60/842,400 5 de Septiembre de 2006 (05.09.2006) US

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): ABBOTT LABORATORIES [US/US]; 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US). ABBOTT GMBH & CO. KG [DE/DE]; Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden (DE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): BARGHORN, Stefan [DE/DE]; Berliner Str. 30, 68161 Mannheim (DE). EBERT, Ulrich [DE/DE]; Königstuhlstr. 6, 68163 Mannheim (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE]; Max-Planck-Str. 17, 67454 Hassloch (DE). KELLER, Patrick [DE/DE]; Bernhardstr. 30, 64291 Darmstadt (DE). STRIEBINGER, Andreas [DE/DE]; Ziegelofenweg 46A, 67346 Speyer (DE). LABKOVSKY, Boris [US/US]; 115 Union Road, P.O.Box 7, Wales, MA 01801 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones
- con (una) indicación(es) en relación con material biológico depositado proporcionado bajo la Regla 13bis separadamente de la descripción

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:

26 de Julio de 2007

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

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A $\beta$ , PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ÉSTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS

(57) Resumen: Anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ , porciones de unión a antígeno de éstos, hibridomas correspondientes, ácidos nucleicos, vectores, células huésped, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos, y métodos para usar dichos anticuerpos. La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$  que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42), porciones de unión a antígeno de éstos, hibridomas que producen dichos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden dichos vectores, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos en terapia y diagnóstico, y métodos correspondientes relacionados con la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
7 June 2007 (07.06.2007)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2007/062852 A3

(51) International Patent Classification:  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/04 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)

(74) Agent: REIFSTÖTTER-KINZEBACH; Reifstötter,  
Kinzebuch & Partner (GmbH), Sternwartstrasse 4, 81679  
München (DE).

(21) International Application Number:  
PCT/EP2006/011530

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EF, 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, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
30 November 2006 (30.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/740,866 30 November 2005 (30.11.2005) US  
60/779,171 3 March 2006 (03.03.2006) US  
60/787,361 30 March 2006 (30.03.2006) US  
60/842,400 5 September 2006 (05.09.2006) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants (for all designated States except US): AB-  
BOTT LABORATORIES [US/US]; 100 Abbott Park  
Road, Abbott Park, IL 60064 (US); ABBOTT GMBH &  
CO. KG [DE/DE]; Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden  
(DE).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological  
material furnished under Rule 13bis separately from the  
description

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BARGHORN,  
Stefan [DE/DE]; Berliner Str. 30, 68161 Mannheim  
(DE). EBERT, Ulrich [DE/DE]; Königstuhlstr. 6,  
68163 Mannheim (DE). HILLEN, Heinz [DE/DE];  
Max-Planck-Str. 17, 67454 Hassloch (DE). KELLER,  
Patrick [DE/DE]; Bernhardstr. 30, 64291 Darmstadt  
(DE). STRIEHINGER, Andreas [DE/DE]; Ziegelofen-  
weg 46A, 67346 Speyer (DE). LABKOVSKY, Boris  
[US/US]; 115 Union Road, P.O.Box 7, Wales, MA 01801  
(US).

(88) Date of publication of the International search report:  
26 July 2007

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

(54) Title: ANTI-A $\beta$  GLOBULOMER ANTIBODIES, ANTIGEN-BINDING MOIETIES THEREOF, CORRESPONDING HY-  
BRIDOMAS, NUCLEIC ACIDS, VECTORS, HOST CELLS, METHODS OF PRODUCING SAID ANTIBODIES, COMPOSI-  
TIONS COMPRISING SAID ANTIBODIES, USES OF SAID ANTIBODIES AND METHODS OF USING SAID ANTIBODIES

(57) Abstract: Anti-A $\beta$  globulomer antibodies, antigen-binding moieties thereof, corresponding hybridomas, nucleic acids, vec-  
tors, host cells, methods of producing said antibodies, compositions comprising said antibodies, uses of said antibodies and methods  
of using said antibodies. The present invention relates to anti-A $\beta$  globulomer antibodies having a binding affinity to A $\beta$ (20-42) glob-  
ulomer that is greater than the binding affinity of the antibody to A $\beta$ (1-42) globulomer, antigen-binding moieties thereof, hybridomas  
producing said antibodies, nucleic acids encoding said antibodies, vectors comprising said nucleic acids, host cells comprising said  
vectors, methods of producing said antibodies, compositions comprising said antibodies, therapeutic and diagnostic uses of said  
antibodies and corresponding methods relating to Alzheimer's disease and other amyloidoses.

WO 2007/062852 A3

# TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

De la  
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

**PCT**

ver forma PCT/ISA/220

## OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de correo  
(día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Registro de referencia del solicitante  
o agente  
ver forma PCT/ISA/220

**PARA FUTURAS ACCIONES**  
Ver párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.

Fecha de registro internacional  
(día/mes/año)

Fecha de prioridad  
(día/mes/año)

PCT/EP2006/011530

30.11.2006

30.11.2005

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC  
INV. C07K16/18 C07K14/47 A61K38/04

Solicitante

ABBOTT LABORATORIES

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Casilla No. I Bases de la opinión
- ☐ Casilla No. II Prioridad
- ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- ☒ Casilla No. IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- ☒ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

### 2. ACCIONES FUTURAS

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA:  
Oficina Europea de Patentes - P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas  
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl  
Fax: +31 70 340 - 3016

Fecha de terminación  
de esta opinión  
  
ver forma  
PCT/ISA/210

Funcionario Autorizado  
  
Masturzo, Pietro  
  
Teléfono No. +31 70 340-2275

---

Casilla No. 1 Bases de la opinión

---

1. Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida sobre las bases de:  
☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó  
  
☐ una traducción de la solicitud internacional en \_\_\_\_\_, el cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
  - a. tipo de material:  
☒ un listado de secuencia  
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
  - b. formato de material:  
☒ en formato escrito  
☒ en formato legible por computador
  - c. tiempo de presentación/suministro:  
☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.  
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.  
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

**Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial**

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,  
☒ reivindicaciones Nos. 112-113

porque:

- ☐ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos.                    se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos.                    son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos.                    son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 112-113
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:
- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.
- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación (Forma PCT/ISA/206) para pagar derechos adicionales, el solicitante ha, dentro del límite de tiempo aplicable:  
  
☐ pagado derechos adicionales.  
☐ pagado derechos adicionales bajo protesta y, donde aplique, el derecho de protesta.  
☐ pagado derechos adicionales bajo protesta pero el derecho de protesta aplicable no pagado.  
☒ no pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió no invitar al solicitante para que pague derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es  
  
☐ se ha cumplido.  
☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:  
  

ver hoja separada
4. Por consiguiente, este reporte ha sido establecido con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional:  
  
☐ todas las partes.  
☒ las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos. 1-69, 88-89 (parcialmente), 91-116 (parcialmente)

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Novedad (N)                   | Si: Reivindicaciones                                      |
|                               | No: Reivindicaciones <u>1-69, 88-89, 91-111, 114-116</u>  |
| Nivel Inventivo (IS)          | Si: Reivindicaciones                                      |
|                               | No: Reivindicaciones <u>1-69, 88-89, 91-111, 114-116</u>  |
| Aplicabilidad Industrial (IA) | Si: Reivindicaciones <u>1-69, 88-89, 91-111, 114, 116</u> |
|                               | No Reivindicaciones                                       |

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada



Casilla No. VI Ciertos documentos citados

---

1. Ciertos documentos publicados (Reglas 43*bis*.1 y 70.10)  
y/o
2. Descripciones no escritas (Reglas 43*bis*.1 y 70.9)  
ver forma 210

**Re Ítem III**

**No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial**

Las reivindicaciones 112-113 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por la disposición de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

**Re Ítem IV**

**Falta de unidad de invención**

Se considera que el problema objetivo implícito en la presente solicitud es proporcionar anticuerpos alternativos capaces de unir la proteína amiloide A-beta de la enfermedad de Alzheimer y por lo tanto producir efectos de diagnóstico y terapéuticos sobre la enfermedad en cuestión. La solución propuesta por el solicitante ha sido proporcionar anticuerpos que tengan mayor afinidad por el globulómero A-beta (20-42) que por el globulómero A-beta (1-42) de la proteína amiloide del Alzheimer. Del documento WO-A-2004067561, de la misma compañía que el presente, puede verse que los globulómeros que caben dentro de la definición anterior (es decir, globulómeros A-beta (20-42) de la proteína amiloide del Alzheimer han sido preparados (reivindicación 11) y se fabricaron anticuerpos dirigidos contra ellos (reivindicación 34). Puesto que el problema objetivo ya había sido formulado en la fecha de prioridad y las soluciones a él, la superposición con el propuesto en la presente solicitud, había sido revelado, no puede reconocerse ningún concepto inventivo común para la materia objeto de la presente solicitud. La División de Búsqueda ha identificado varios sujetos diferentes, únicamente el primero de los cuales ha sido buscado. Para cada búsqueda adicional deben cancelarse honorarios de búsqueda. La lista de los sujetos identificados se proporciona a continuación.

Sujeto 1: reivindicaciones 1-69, 88-89 (parcialmente), 91-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Los anticuerpos que tienen afinidad de unión con un globulómero A-beta (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo a un globulómero A-beta (1-42), mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 2: reivindicaciones 70-77, 88-89 (parcialmente), 91-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpos que comprenden al menos un dominio variable que tiene una secuencia aminoácido seleccionada de los grupos de Seqq- ldd. Nos. 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20, 23-24, 27-28, 31-32, 35-36 y 38, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 3: reivindicaciones 78, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7241, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 4: reivindicaciones 79, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7239, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 5: reivindicaciones 80, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7240, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 6: reivindicaciones 81, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7242, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 7: reivindicaciones 82, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7408, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 8: reivindicaciones 83, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7409, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 9: reivindicaciones 84, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7405, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 10: reivindicaciones 85, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7809, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 11: reivindicaciones 86, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7810, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

Sujeto 12: reivindicaciones 87, 88-111 (parcialmente), 114-116 (parcialmente).

Anticuerpo monoclonal obtenible de un hibridoma designado por el número de depósito ATCC PTA-7851, mitades ligantes del antígeno de estos anticuerpos, hibridomas que los producen, ácidos nucleicos que los codifican, vectores y células hospederas que contienen estos ácidos nucleicos, métodos para producirlos, composiciones que los contienen y sus usos en terapia y diagnóstico.

#### Re Ítem V

**Afirmación razonada respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación**

Se hace referencia al siguiente documento:

D1: WO-A-2004067561 (Abbott GmbH & Co.), 12 de Agosto de 2004.

1) El solicitante ha proporcionado anticuerpos que se dice que exhiben una mayor afinidad por el globulómero A-beta (20-42) que por el globulómero A-beta (1-42) de la proteína amiloide del Alzheimer. Del documento WO-A-2004067561, de la misma compañía que el presente, puede verse que los globulómeros que caben dentro de la definición anterior (es decir, globulómeros de A-beta (20-42) de la proteína amiloide del Alzheimer han sido preparados (reivindicación 11) y se fabricaron anticuerpos dirigidos contra ellos (reivindicación 34). Por lo tanto, las reivindicaciones 1-69, 88-89, 91-111 y 114-116 son objetadas bajo el Art. 33(2) PCT porque no son novedosas.

2) Se considera que el problema objetivo implícito en la presente solicitud es proporcionar anticuerpos alternativos capaces de unir la proteína amiloide A-beta de la enfermedad de Alzheimer y por lo tanto producir efectos de diagnóstico y terapéuticos sobre la enfermedad en cuestión. La solución propuesta por el solicitante ha sido proporcionar anticuerpos que tienen mayor afinidad por el globulómero A-beta (20-42) que por el globulómero A-beta (1-42) de la proteína amiloide del Alzheimer. Del documento WO-A-2004067561, de la misma compañía que el presente, puede verse que los globulómeros que caben dentro de la definición anterior (es decir, globulómeros A-beta (20-42) de la proteína amiloide del Alzheimer han sido preparados (reivindicación 11) y se fabricaron anticuerpos dirigidos contra ellos (reivindicación 34). Puesto que el problema objetivo ya había sido formulado en la fecha de prioridad, es evidente para la persona versada diseñar soluciones alternativas, incluyendo la materia objeto de las presentes reivindicaciones 1-69, 88-89, 91-111 y 114-116, que por consiguiente son objetadas bajo el Art. 33(3) PCT porque les falta nivel inventivo.

3) Las reivindicaciones 1-69, 88-89, 91-111 y 114-116 tienen aplicabilidad industrial bajo el Art. 33(4) PCT.

**Re Ítem VI**  
**Ciertos documentos citados**

Ciertos documentos publicados

| Solicitud No.<br>Patente No. | Fecha de publicación<br>(día/mes/año) | Fecha de radicación<br>(día/mes/año) | Fecha de prioridad (reivindicación<br>válida)<br>(día/mes/año) |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| WO-A-2006094724              | 14-9-2006                             | 3-3-2006                             | 5-3-2005                                                       |

PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

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

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

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

FOR FURTHER ACTION  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/EP2006/011530

International filing date (day:month:year)  
30.11.2006

Priority date (day:month:year)  
30.11.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. C07K16/18 C07K14/47 A61K38/04

Applicant  
ABBOTT LABORATORIES

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

2. FURTHER ACTION

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

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

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

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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                  |                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Name and mailing address of the ISA:<br><br>European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas<br>Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl<br>Fax: +31 70 340 - 3016 | Date of completion of<br>this opinion<br>see form<br>PCT/ISA/210 | Authorized Officer<br><br>Masturzo, Pietro<br><br>Telephone No. +31 70 340-2275<br> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/EP2006/011530

**Box No. I Basis of the opinion**

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

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

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed.
- ☒ filed together with the international application in electronic form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:



WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/EP2006/011530

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 112-113

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 112-113

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.  
PCT/EP2006/011530

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
  - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
  - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:  
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
  - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-69, 88-89 (partially), 91-116 (partially)

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

1. Statement

|                               |             |                                     |
|-------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims |                                     |
|                               | No: Claims  | <u>1-69, 88-89, 91-111, 114-116</u> |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |                                     |
|                               | No: Claims  | <u>1-69, 88-89, 91-111, 114-116</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims |                                     |
|                               | No: Claims  | <u>1-69, 88-89, 91-111, 114-116</u> |

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.  
PCT/EP2006/011530

---

**Box No. VI Certain documents cited**

---

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)  
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)  
see form 210

**Re Item III**

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

Claims 112-113 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

**Re Item IV**

**Lack of unity of invention**

The objective problem underlying the present application is considered to provide alternative antibodies able to bind the A-beta amyloid protein of Alzheimer disease and therefore elicit diagnostic and therapeutic effects on the disease in question. The solution proposed by the applicant has been to provide antibodies having a greater affinity for the globulomer A-beta (20-42) than for the globulomer A-beta (1-42) of the Alzheimer amyloid protein. From the document WO-A-2004067561, from the same company as the present one, it can be seen that globulomers fitting in the above definition (i. e. globulomers of A-beta (20-42) of the Alzheimer amyloid protein have been prepared (claim 11) and antibodies directed against them were manufactured (claim 34). Since the objective problem had been already formulated at the priority date and solutions to it, overlapping with the one proposed in the present application, had been disclosed, no common inventive concept can be recognized for the subject matter of the present application. The Search Division has identified several different subjects, only the first of which has been searched. For every additional search a search fee will be due. The list of the identified subjects is provided below.

Subject 1: claims 1-69, 88-89 (partially), 91-111 (partially), 114-116 (partially).

Antibodies having a binding affinity to an A-beta (20-42) globulomer that is greater than the binding affinity of the antibody to an A-beta (1-42) globulomer, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in

therapy and diagnostics.

Subject 2: claims 70-77, 88-89 (partially), 91-111 (partially), 114-116 (partially).

Antibodies comprising at least a variable domain having an amino acid sequence selected from the groups of Seqq. ldd. nos. 3-4, 7-8, 11-12, 15-16, 19-20,, 23-24, 27-28, 31-32, 35-36 and 38, antigen-binding moieties of these antibodies, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.



Subject 3: claims 78, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7241, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 4: claims 79, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7239, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.



Subject 5: claims 80, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7240, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 6: claims 81, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7242, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 7: claims 82, 88-111 (partially), 114-116 (partially).



Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7408, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 8: claims 83, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7409, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.



Subject 9: claims 84, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7405, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 10: claims 85, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7809, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 11: claims 86, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7810, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

Subject 12: claims 87, 88-111 (partially), 114-116 (partially).

Monoclonal antibody obtainable from a hybridoma designated by ATCC deposit number PTA-7851, antigen-binding moieties of these antibodies, hybridomas producing them, nucleic acids encoding them, vectors and host cells containing these nucleic acids, methods of producing them, compositions containing them and their uses in therapy and diagnostics.

**Re Item V**

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

Reference is made to the following document:

D1: WO-A-2004067561 (Abbott GmbH & Co.), 12 August 2004.

1) The applicant has provided antibodies said to exhibit a greater affinity for the globulomer A-beta (20-42) than for the globulomer A-beta (1-42) of the Alzheimer amyloid protein. From the document WO-A-2004067561, from the same company as the present one, it

can be seen that globulomers fitting in the above definition (i. e. globulomers of A-beta (20-42) of the Alzheimer amyloid protein have been prepared (claim 11) and antibodies directed against them were manufactured (claim 34). Therefore claims 1-69, 88-89, 91-111 and 114-116 are objected to under Art. 33(2) PCT because they are not novel.

2) The objective problem underlying the present application is considered to provide alternative antibodies able to bind the A-beta amyloid protein of Alzheimer disease and therefore elicit diagnostic and therapeutic effects on the disease in question. The solution proposed by the applicant has been to provide antibodies having a greater affinity for the globulomer A-beta (20-42) than for the globulomer A-beta (1-42) of the Alzheimer amyloid protein. From the document WO-A-2004067561, from the same company as the present one, it can be seen that globulomers fitting in the above definition (i. e. globulomers of A-beta (20-42) of the Alzheimer amyloid protein have been prepared (claim 11) and antibodies directed against them were manufactured (claim 34). Since the objective problem had been already formulated at the priority date, it is evident for the skilled person to devise alternative solutions to it, including those including the subject matter of present claims 1-69, 88-89, 91-111 and 114-116, which are as a consequence objected to under Art. 33(3) PCT since they lack inventive step.

3) Claims 1-69, 88-89, 91-111 and 114-116 are endowed with industrial applicability under Art. 33(4) PCT.

**Re Item VI**

**Certain documents cited**

**Certain published documents**

| Application No<br>Patent No | Publication date<br>(day/month/year) | Filing date<br>(day/month/year) | Priority date (valid claim)<br>(day/month/year) |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| WO-A-2006094724             | 14-9-2006                            | 3-3-2006                        | 5-3-2005                                        |



**ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A $\beta$ , PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ÉSTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS**

**RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION**

Anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ , porciones de unión a antígeno de éstos, hibridomas correspondientes, ácidos nucleicos, vectores, células huésped, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos, y métodos para usar dichos anticuerpos.

La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$  que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42), porciones de unión a antígeno de éstos, hibridomas que producen dichos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden dichos vectores, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos en terapia y diagnóstico, y métodos correspondientes relacionados con la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

**ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO A $\beta$ , PORCIONES DE UNIÓN A  
ANTÍGENO DE ÉSTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS  
NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA  
PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE  
COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS  
ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS**

La presente invención se relaciona con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ , porciones de unión a antígeno de éstos, hibridomas que producen dichos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, células huésped que comprenden dichos vectores, métodos para producir dichos anticuerpos, composiciones que comprenden dichos anticuerpos, usos de dichos anticuerpos en terapia y diagnóstico, y métodos correspondientes, relacionados con la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis.

En 1907, el médico Alois Alzheimer describió por primera vez las características neuropatológicas de una forma de demencia nombrada posteriormente en su honor (Alzheimer 1907). La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa de demencia más frecuente entre las personas de edad, con una incidencia de aproximadamente 10% entre la población con una edad superior a 65 años. Al aumentar la edad, también aumenta la probabilidad de contraer la enfermedad. En el mundo hay aproximadamente 15 millones de personas afectadas, y se espera que los incrementos en la expectativa de vida resulten en el aumento de la cantidad de personas enfermas hasta aproximadamente el triple durante las siguientes décadas.

Desde un punto de vista molecular, la enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza por el depósito de proteínas agregadas de forma anormal. En el caso de las placas amiloides extracelulares, estos depósitos consisten principalmente en filamentos de péptidos  $\beta$  amiloides, en el caso de las redes neurofibrilares intracelulares (NFT) de la proteína tau. El péptido  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) surge de la proteína precursora  $\beta$ -amiloide merced a un corte proteolítico. Este corte es efectuado por la actividad cooperativa de varias proteasas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa. El corte resulta en una cantidad de fragmentos específicos con distintas longitudes. Las placas amiloides consisten principalmente en péptidos con una longitud de 40 ó 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ). El producto de corte dominante es  $A\beta_{40}$ ; sin embargo,  $A\beta_{42}$  tiene un efecto tóxico mucho más fuerte.

Los depósitos amiloides cerebrales y las alteraciones cognitivas muy similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer también son característicos del síndrome de Down (trisomía 21), que ocurre con una frecuencia de aproximadamente 1 cada 800 nacimientos.

La hipótesis de la cascada amiloide de Hardy y Higgins postula que la producción incrementada de  $A\beta(1-42)$  resulta en la formación de protofibrillas y fibrillas, los componentes principales de las placas  $A\beta$ , donde estas fibrillas son responsables de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. A pesar de la correlación baja entre la severidad de la demencia y la carga de placas  $A\beta$  depositadas, esta hipótesis fue favorecida hasta hace poco tiempo. El descubrimiento de formas solubles de  $A\beta$  en los cerebros con AD, que se correlacionan mejor con los síntomas de la AD que la carga de placas, ha resultado en una hipótesis revisada de la cascada amiloide.

La inmunización activa con péptidos A $\beta$  ha resultado en una reducción de la formación, y también en la disolución parcial de las placas existentes. Al mismo tiempo, resulta en el alivio de los defectos cognitivos en modelos de ratones transgénicos APP.

También se verificó una reducción de la carga de placas A $\beta$  para la inmunización pasiva con anticuerpos dirigidos a los péptidos A $\beta$ .

Los resultados de una prueba de fase IIa (ELAN Corporation Plc, San Francisco Sur, CA, EEUU, y Dublín, Reino Unido) de inmunización activa con AN-1792 (péptido A $\beta$ (1-42) en una condición de agregación fibrilar) sugieren que la inmunoterapia dirigida a los péptidos A $\beta$  fue exitosa. En un subgrupo de 30 pacientes, el progreso de la enfermedad se vio reducido significativamente en pacientes con una titulación positiva de anticuerpos anti-A $\beta$ , medida de acuerdo con los índices MMSE y DAD. Sin embargo, este estudio fue interrumpido debido a los efectos colaterales serios, en forma meningoencefalitis (Bennett y Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12).

La meningoencefalitis fue caracterizada por la neuroinflamación y la infiltración de células T en el cerebro. Presumiblemente, esto se debió a una respuesta inmune mediada por células T, inducida por el rechazo de A $\beta$ (1-42) como antígeno. Esta respuesta inmune no habría de esperarse después de una inmunización pasiva. Hasta la fecha, no hay datos clínicos disponibles con referencia a esto. Sin embargo, con referencia a este abordaje pasivo, se invocaron riesgos de inmunización relacionados con el perfil de efectos colaterales, que se basó en estudios preclínicos en ratones APP23 muy viejos que recibieron un anticuerpo dirigido contra un epítopo N-terminal de A $\beta$ (1-42) una vez por semana durante 5 meses. Estos ratones presentaron un

incremento en la cantidad y la severidad de microhemorragias en comparación con los animales control tratados con solución salina (Pfeifer et al., 2002, *Science*, 298, 1379). También se describió un incremento comparable en las microhemorragias en ratones Tg2576 y PDAPP muy viejos (de más de 24 meses) (Racke et al., 2005, *J Neurosci*, 25, 629-636; Wilcock et al. 2004, *J. Neuroinflammation*, 1(1):24; De Mattos et al., 2004, *Neurobiol. Aging* 25(S2):577). En ambas cepas de ratones, la inyección de anticuerpos resultó en un incremento significativo de las microhemorragias. En contraste, un anticuerpo dirigido contra la región central del péptido A $\beta$ (1-42) no indujo microhemorragias (de Mattos et al., *supra*). La ausencia de inducción de microhemorragias fue asociada con el tratamiento con anticuerpos que no se unieron al proteína A $\beta$  agregado en forma de CAA (Racke et al., *J Neurosci*, 25, 629-636). Sin embargo, el mecanismo exacto que resulta en las microhemorragias en ratones transgénicos para APP aún no ha sido comprendido. Presumiblemente, la angiopatía amiloide cerebral (CAA) induce o al menos agrava las hemorragias cerebrales. La CAA está presente en casi todos los cerebros con enfermedad de Alzheimer, y aproximadamente 20% de los casos se consideran como "CAA severa". Por consiguiente, la inmunización pasiva debería tener por objeto evitar las microhemorragias al seleccionar un anticuerpo que reconociera la región central o carboxiterminal del péptido A $\beta$ .

En WO2004/067561 se describen oligómeros A $\beta$ (1-42) estables (globulómeros A $\beta$ (1-42)) y anticuerpos dirigidos específicamente contra los globulómeros. La digestión con proteasas no específicas demuestra que el globulómero A $\beta$  puede digerirse comenzando con el extremo N hidrofílico que sobresale de la estructura globular principal (Barghorn et al., 2005, *J*

Neurochem, 95, 834-847). Estos globulómeros A $\beta$  con un corte N terminal (globulómeros A $\beta$ (12-42) y A $\beta$ (20-42)) representan la unidad estructural básica de este oligómero A $\beta$ . Son antígenos muy potentes para la inmunización activa de conejos y ratones que resulta en titulaciones de anticuerpos elevadas (WO2004/067561). La función patológica principal de las formas de A $\beta$  con cortes N terminales in vivo ha sido sugerida en diversas publicaciones recientes donde se describió su existencia en cerebros con AD (Sergeant et al., 2003, J Neurochem, 85, 1581-1591; Thal et al., 1999, J Neuropathol. Exp Neurol, 58, 210-216). Durante la digestión in vivo pueden participar determinadas proteasas halladas en el cerebro, por ejemplo, la neprilisina (NEP 24.11) o la enzima degradadora de insulina (IDE) (Selkoe, 2001, Neuron, 32, 177-180).

Un objeto de la presente invención fue proporcionar anticuerpos dirigidos contra globulómeros A $\beta$  que permitieran mejorar el desempeño cognitivo de un paciente sometido a inmunoterapia, y que al mismo tiempo reaccionaran solamente con una pequeña porción del péptido A $\beta$  completo en el cerebro. Se espera que esto prevenga una alteración sustancial del equilibrio de A $\beta$  en el cerebro y resulte en menos efectos colaterales (por ejemplo, se ha observado una reducción cuestionable desde el punto de vista terapéutico en el estudio de inmunización activa con péptidos A $\beta$  en una condición de agregación fibrilar (prueba ELAN con AN1792)). Más aún, en esta prueba se observaron efectos colaterales severos en forma de meningoencefalitis.

La presente invención soluciona este problema al proporcionar anticuerpos específicos para globulómeros que poseen una afinidad elevada por formas truncadas de globulómeros A $\beta$ . Estos anticuerpos permiten

discriminar no solamente otras formas de péptidos A $\beta$ , particularmente monómeros y fibrillas, sino también formas no truncadas de globulómeros A $\beta$ .

Por ende, la presente invención se relaciona con un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión de este anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

Además, la presente invención se relaciona con un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión de este anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (12-42).

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42) y el globulómero A $\beta$ (12-42).

En la presente documentación, el término "A $\beta$ (X-Y)" hace referencia a la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo X e Y, en particular, la secuencia de aminoácidos desde la posición del aminoácido X hasta la posición del aminoácido Y de la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IAT (que corresponde a las posiciones de los aminoácidos 1 a 43), o cualquiera de sus variantes de ocurrencia natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo la posición X y la posición Y, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede

prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 12 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 42 o Y, el que sea menor de ambos, más preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 42 o Y, el que sea menor de ambos, y más preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 o X, el que sea mayor de ambos, y el aminoácido 40 o Y, el que sea menor de ambos, donde en la presente documentación, una sustitución de aminoácido "adicional" es cualquier desviación de la secuencia canónica que no pueda hallarse en la naturaleza.

Más específicamente, el término "A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 1 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo 1 y 42, en particular, la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA, o cualquiera de sus variantes de ocurrencia natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 1 y 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 42. Del mismo modo, el término "A $\beta$ (1-40)" hace referencia en la presente documentación a la



secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 1 y la posición del aminoácido 40 de la proteína  $\beta$  amiloide humana incluyendo 1 y 40, en particular, la secuencia de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKG A IIGLMVGGVV o cualquiera de sus variantes de ocurrencia natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), y D23N ("Iowa"), donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 1 y 40, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 40.

Más específicamente, el término "A $\beta$ (12-42)" hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 12 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo 12 y 42, en particular, la secuencia de aminoácidos VHHQKLVFF AEDVGSNKG A IIGLMVGGVV IA, o cualquiera de sus variantes de ocurrencia natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 12 y 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales en la porción entre el aminoácido 20 y el aminoácido 42.

Más específicamente, el término "A $\beta$ (20-42)" hace referencia en la presente documentación a la secuencia de aminoácidos entre la posición del aminoácido 20 y la posición del aminoácido 42 de la proteína  $\beta$  amiloide humana, incluyendo 20 y 42, en particular, la secuencia de aminoácidos F AEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA, o cualquiera de sus variantes de ocurrencia natural, en particular, aquellas con al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T y A42V, donde los números se basan en el inicio del péptido A $\beta$ , incluyendo 20 y 42, o una secuencia con hasta tres sustituciones de aminoácidos adicionales, ninguna de las cuales puede prevenir la formación del globulómero, preferiblemente sin sustituciones de aminoácidos adicionales.

El término "globulómero A $\beta$ (X-Y)" (oligómero globular A $\beta$ (X-Y)) hace referencia en la presente documentación a una asociación no covalente, globular y soluble de péptidos A $\beta$ (X-Y), como se los definió con anterioridad, que posee homogeneidad y características físicas distintivas. De acuerdo con un aspecto, los globulómeros A $\beta$ (X-Y) son ensamblajes oligoméricos no fibrilares estables de péptidos A $\beta$ (X-Y) que se obtienen por medio de una incubación con detergentes aniónicos. En contraste con los monómeros y las fibrillas, estos globulómeros se caracterizan por una cantidad definida de subunidades de ensamblaje (por ejemplo, formas de ensamblaje tempranas,  $n = 4-6$ , "oligómeros A", y formas de ensamblaje tardías,  $n = 12-14$ , "oligómeros B", como se describe en WO2004/067561). Los globulómeros tienen una estructura tridimensional de tipo globular ("glóbulo fundido", véase Barghorn et

al., 2005, J Neurochem, 95, 834-847). Además, pueden caracterizarse por una o más de los siguientes parámetros:

- posibilidad de separación de los aminoácidos N-terminales X-23 debido a la acción de proteasas promiscuas (tales como termolisina o endoproteinasa GluC), lo que proporciona formas truncadas de globulómeros;
- ausencia de accesibilidad de los aminoácidos de C-terminales 24-Y a las proteasas promiscuas y los anticuerpos;
- las formas truncadas de estos globulómeros mantienen la estructura tridimensional principal de dichos globulómeros con una mejor accesibilidad del epítipo principal A $\beta$ (20-Y) en su conformación de globulómero.

De acuerdo con la invención, y en particular con el propósito de evaluar las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención, el término "globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en particular en la presente documentación a un producto que se obtiene con un proceso como se describe en WO 2004/067561, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia.

Dicho proceso comprende desplegar un péptido A $\beta$ (X-Y) natural, recombinante o sintético, a un derivado de éste; exponer el péptido A $\beta$ (X-Y) al menos parcialmente desplegado A $\beta$ (X-Y), o un derivado de éste, a un detergente, reducir la acción del detergente; y continuar la incubación.

Con el objeto de desplegar el péptido, pueden aplicarse agentes que rompen enlaces hidrógeno, tales como, por ejemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP), sobre la proteína. Son suficientes períodos de acción de unos pocos minutos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y 60 minutos, cuando la temperatura de la acción es de entre 20 y 50°C, y en particular entre

aproximadamente 35 y 40°C. La disolución subsiguiente del residuo evaporado hasta la sequedad, preferiblemente en una forma concentrada, en solventes orgánicos miscibles con amortiguadores acuosos, tales como, por ejemplo, dimetil sulfoxido (DMSO), resulta en una suspensión del péptido desplegado al menos parcialmente, o el derivado de éste, que puede usarse posteriormente. De ser necesario, la suspensión madre puede almacenarse a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente -20°C, por un período intermedio.

Como alternativa, el péptido, o el derivado de éste, puede tomarse en una solución ligeramente ácida, preferiblemente acuosa, por ejemplo, en una solución de HCl aproximadamente 10 mM. Después de un período de incubación que comúnmente es de unos pocos minutos, los componentes insolubles se eliminan por centrifugación. Unos pocos minutos a 10000 G sirven para cumplir dicho objetivo. Estos pasos del método preferiblemente se llevan a cabo a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura en el rango de entre 20 y 30°C. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene el péptido A $\beta$ (X-Y), o el derivado de éste, y puede almacenarse a baja temperatura, por ejemplo, a aproximadamente -20°C, por un período intermedio.

La exposición posterior a un detergente tiene por objeto la oligomerización del péptido, o el derivado de éste, para obtener un tipo intermedio de oligómeros (denominados oligómeros A en WO 2004/067561). Con este fin, se aplica un detergente sobre el péptido desplegado al menos parcialmente, o el derivado de éste, hasta que se ha producido suficiente oligómero intermedio.

Se prefiere el uso de detergentes iónicos, en particular, detergentes

aniónicos.

De acuerdo con una realización particular, se usa un detergente de fórmula (I):

$R-X$ ,

donde

el radical R es un alquilo no ramificado o ramificado que tiene entre 6 y 20, y preferiblemente entre 10 y 14 átomos de carbono, o un alquenilo ramificado o ramificado que tiene entre 6 y 20, y preferiblemente entre 10 y 14 átomos de carbono,

el radical X es un grupo ácido, o una sal de éste, donde X preferiblemente se selecciona entre  $-COO^-M^+$ ,  $-SO_3^-M^+$ , y especialmente  $-OSO_3^-M^+$ , y  $M^+$  es un catión hidrógeno o un catión inorgánico u orgánico seleccionado preferiblemente entre cationes de metales alcalinos y metales alcalinos térreos, y cationes de amonio.

Resultan ventajosos los detergentes de fórmula (I) donde R es un alquilo no ramificado, de los cuales ha de hacerse la mención particular de los radicales alqu-1-ilo. En particular, se prefiere el dodecil sulfato de sodio (SDS). También puede usarse ventajosamente ácido láurico y ácido oleico. La sal de sodio del detergente laurilsarcosina (también conocido como sarcosil NL-30 o Gardol<sup>®</sup>) también es particularmente ventajosa.

El período de acción del detergente depende en particular de si el péptido sometido a la oligomerización, o el derivado de éste, se ha desplegado o no, y en el primer caso, en qué medida. Si, de acuerdo con el paso de despliegue, el péptido o el derivado de éste ha sido tratado con antelación con un agente para romper enlaces hidrógeno, es decir, en particular, con

hexafluoroisopropanol, son suficientes períodos de acción en el rango de unas pocas horas, ventajosamente entre aproximadamente 1 y 20, y en particular entre aproximadamente 2 y 10 horas, cuando la temperatura de la acción es de entre aproximadamente 20 y 50°C, y en particular entre aproximadamente 35 y 40°C. Si como punto inicial se usa un péptido menos desplegado o un péptido esencialmente no desplegado, o un derivado de éste, han de ser necesarios periodos de acción más prolongados. Si el péptido o el derivado de éste han sido sometidos a un tratamiento previo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento indicado con anterioridad, como alternativa al tratamiento con HFIP, o si dicho péptido, o el derivado de éste, ha sido sometido directamente a una oligomerización, son suficientes períodos de acción en el rango de entre aproximadamente 5 y 30 horas, y en particular, entre aproximadamente 10 y 20 horas, cuando la temperatura de acción es de entre aproximadamente 20 y 50°C, y en particular, entre aproximadamente 35 y 40°C. Después de la incubación, los componentes insolubles se eliminan ventajosamente por centrifugación. Para esto son suficientes unos pocos minutos a 10000 G.

La concentración de detergente a elegir depende del detergente usado. Si se usa SDS, resulta apropiada una concentración en el rango de entre 0,01 y 1% en peso, preferiblemente entre 0,05 y 0,5% en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,2% en peso. Si se usa ácido láurico o ácido oleico, han de necesitarse concentraciones algo mayores, por ejemplo, en el rango de entre 0,05 y 2% en peso, preferiblemente entre 0,1 y 0,5% en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% en peso.

La acción del detergente debería tener lugar a una concentración de sal aproximadamente en el rango fisiológico. Por lo tanto, en particular, resultan

útiles concentraciones de NaCl en el rango de entre 50 y 500 mM, preferiblemente entre 100 y 200 mM, y en particular de aproximadamente 140 mM.

La reducción subsiguiente de la acción del detergente y la continuación de la incubación tienen por objeto continuar con la oligomerización para obtener el globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención (conocido en WO 2004/067561 como oligómero B). Como la composición obtenida en el paso de preparación contiene detergente y la concentración de sal se halla en el rango fisiológico, es necesario reducir la acción del detergente, y preferiblemente, también la concentración de sal. Esto puede realizarse reduciendo la concentración del detergente y la sal, por ejemplo, por medio de una dilución, preferiblemente con agua o un amortiguador con una concentración de sal baja, por ejemplo, Tris-HCl, pH 7,3. Los factores de dilución en el rango de entre aproximadamente 2 y 10, ventajosamente en el rango de entre aproximadamente 3 y 8, y en particular, de aproximadamente 4, han probado ser apropiados. La reducción de la acción del detergente también puede efectuarse agregando sustancias que pueden neutralizar la acción de dicho detergente. Los ejemplos de estas sustancias incluyen sustancias capaces de formar complejos con los detergentes, tales como sustancias capaces de estabilizar las células en el transcurso de los procedimientos de purificación y extracción, por ejemplo, copolímeros de bloques EO/PO particulares, en particular, el copolímero de bloques con la marca comercial Pluronic<sup>®</sup> F 68. Del mismo modo, pueden usarse alquil fenoles alcoxilados, y en particular, etoxilados, tales como los t-octilfenoles etoxilados de la serie Triton<sup>®</sup> X, en particular, Triton<sup>®</sup> X100, 1-propansulfonato de 3-(3-colamidopropildimetilamonio) (CHAPS<sup>®</sup>), o ésteres de

ácidos grasos con sorbitán alcoxilados, y particular, etoxilados, tales como aquellos de la serie Tween®, en particular, Tween® 20, en rangos de concentración aproximadamente iguales o superiores a la concentración crítica de las micelas.

Después, la solución se incuba hasta que se ha producido una cantidad suficiente del globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención. Son suficientes periodos de acción en el rango de varias horas, preferiblemente en el rango de entre aproximadamente 10 y 30 horas, y en particular, en el rango de entre aproximadamente 15 y 25 horas, cuando la temperatura de la acción es de entre aproximadamente 20 y 50°C, y en particular, entre aproximadamente 35 y 40°C. Después, la solución puede concentrarse, y los residuos posibles pueden eliminarse por centrifugación. En este caso también son útiles unos pocos minutos a 10000 G. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación contiene un globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención.

Finalmente, un globulómero A $\beta$ (X-Y) de la invención puede recuperarse de una manera conocida se, por ejemplo, por ultrafiltración, diálisis, precipitación o centrifugación.

Además, es preferible si la separación por electroforesis de los globulómeros A $\beta$ (X-Y) bajo condiciones de desnaturalización, por ejemplo, por SDS-PAGE, produce una banda doble (por ejemplo, con un peso molecular aparente de 38/48 kDa para A $\beta$ (1-42)), y es especialmente preferible si al realizar el tratamiento con glutardialdehído de los globulómeros antes de la separación de estas dos bandas, dichas bandas se fusionan en una. También es preferible que la cromatografía de exclusión por tamaño de los globulómeros resulta en un solo pico (por ejemplo, que corresponde a un peso molecular de



aproximadamente 100 kDa para el globulómero A $\beta$ (1-42), o de aproximadamente 60 kDa para el globulómero A $\beta$ (1-42)) reticulado con glutardialdehído, respectivamente.

Comenzando con el péptido A $\beta$ (1-42), el péptido A $\beta$ (12-42) y el péptido A $\beta$ (20-42), dichos procesos son particularmente apropiados para obtener globulómeros A $\beta$ (1-42), globulómeros A $\beta$ (12-42) y globulómeros A $\beta$ (20-42).

En una realización particular de la invención, los globulómeros A $\beta$ (X-Y), donde X se selecciona del grupo que consiste en los números 2 a 24 e Y es como se definió con anterioridad, son aquellos que se obtienen cortando los globulómeros A $\beta$ (1-Y) en formas más cortas, donde X se selecciona del grupo que consiste en los números 2 a 24, donde X preferiblemente es 20 ó 12, e Y es como se definió con anterioridad, lo que puede lograrse por medio de un tratamiento con proteasas apropiadas. Por ejemplo, un globulómero A $\beta$ (20-42) puede obtenerse sometiendo un globulómero A $\beta$ (1-42) a una proteólisis con termolisina, y un globulómero A $\beta$ (12-42) puede obtenerse sometiendo un globulómero A $\beta$ (1-42) a una proteólisis con endoproteinasa GluC. Cuando se alcanza el grado deseado de proteólisis, la proteasa se inactiva de una manera generalmente conocida. Después, los globulómeros resultantes pueden aislarse de acuerdo con los procedimientos ya descritos en la presente documentación, y de ser necesario, pueden someterse a un procesamiento adicional, con pasos adicionales de modificación y purificación. Se proporciona una descripción detallada de dichos procesos en WO 2004/067561, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia.

Para los propósitos de la presente invención, un globulómero A $\beta$ (1-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (1-42), que se describe en el ejemplo 1a en

la presente documentación; un globulómero A $\beta$ (20-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (20-42), que se describe en el ejemplo 1c en la presente documentación, y un globulómero A $\beta$ (12-42) es en particular el globulómero A $\beta$ (12-42), que se describe en el ejemplo 1d en la presente documentación.

Preferiblemente, el globulómero presenta afinidad por células neuronales. Preferiblemente, el globulómero también presenta efectos de neuromodulación.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el globulómero consiste en entre 11 y 16, y más preferiblemente, entre 12 y 14 péptidos A $\beta$ (X-Y).

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el término "globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en subunidades A $\beta$ (X-Y), donde es preferible que en promedio al menos 11 de las 12 subunidades sean del tipo A $\beta$ (X-Y), es más preferible si menos de 10% de los globulómeros comprenden algún péptido distinto de A $\beta$ (X-Y), y es más preferible si el contenido de péptidos distintos de A $\beta$ (X-Y) es inferior al umbral de detección.

Más específicamente, el término "globulómero A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (1-42), como se definió con anterioridad; el término "A $\beta$ (12-42) globulómero" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (12-42), como se definió con anterioridad; y el término "A $\beta$ (20-42) globulómero" hace referencia en la presente documentación a un globulómero que consiste esencialmente en unidades A $\beta$ (20-42), como se definió con anterioridad.

El término "globulómero A $\beta$ (X-Y) reticulado" hace referencia en la presente documentación a una molécula que se obtiene por reticulación a partir de un globulómero A $\beta$ (X-Y), como se describió con anterioridad, preferiblemente por reticulación química, más preferiblemente por reticulación con aldehído, más preferiblemente por reticulación con glutardialdehído de las unidades constituyentes del globulómero. En otro aspecto de la invención, un globulómero reticulado es esencialmente un globulómero donde las unidades están unidas al menos parcialmente por enlaces covalentes, en vez de estar unidas solamente por interacciones no covalentes. Para los propósitos de la presente invención, un globulómero reticulado A $\beta$ (1-42) es en particular el oligómero A $\beta$ (1-42) reticulado, como se describe en el ejemplo 1b en la presente documentación.

El término "derivado de globulómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en particular en la presente documentación a un globulómero que está marcado por la unión covalente a un grupo que facilita su detección, preferiblemente un fluoróforo, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, proteína fluorescente de *Aequorea victoria*, proteína fluorescente de *Dictyosoma*, o cualquier combinación o derivado fluorescente activo de éstas; un cromóforo, un quimioluminóforo, por ejemplo, luciferasa, preferiblemente luciferasa de *Photinus pyralis*, luciferasa de *Vibrio fischeri*, o cualquier combinación o derivado fluorescente activo de éstas; un grupo con actividad enzimática, por ejemplo, peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, o cualquier derivado de éste con actividad enzimática; un grupo denso en electrones, por ejemplo, un grupo que contiene un metal pesado, por ejemplo, un grupo que contiene oro; un hapteno, por ejemplo, un hapteno derivado de fenol; una

estructura muy antigénica, por ejemplo, una secuencia peptídica con antigenicidad segura predicha, por ejemplo, con una antigenicidad predicha de acuerdo con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar; un aptámero para otra molécula; un grupo quelante, por ejemplo, hexahistidinilo; una estructura proteica natural o derivada de una natural que media en otras interacciones específicas entre proteínas, por ejemplo, un miembro del par fos/jun; un grupo magnético, por ejemplo, un grupo ferromagnético; o un grupo radiactivo, por ejemplo, un grupo que comprende  $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ , o cualquier combinación de éstos; o un globulómero identificado por una interacción covalente o no covalente de alta afinidad, que preferiblemente está unido de forma covalente a un grupo que facilita la inactivación, la captura, la degradación y/o la precipitación, preferiblemente identificado por un grupo que promueve la degradación in vivo, más preferiblemente ubiquitina, donde es particularmente preferible que este oligómero marcado se ensamble in vivo; o un globulómero modificado con cualquier combinación de los anteriores. Estos grupos de marca e identificación, y los métodos para unirlos a las proteínas son conocidos en la técnica. La marca y/o la identificación pueden realizarse antes, durante o después de la globulomerización. En otro aspecto de la invención, un derivado de globulómero es una molécula que se obtiene a partir de un globulómero por medio de una reacción de marca y/o identificación.

De forma correspondiente, el término "derivado de monómero  $\text{A}\beta(\text{X-Y})$ " hace referencia en particular en la presente documentación a un monómero  $\text{A}\beta$  que está marcado o identificado como se describe para el globulómero.

En la práctica, el anticuerpo de la presente invención se une a un globulómero  $\text{A}\beta(20-42)$  con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a un globulómero A $\beta$ (20-42) con una afinidad elevada, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o con una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-10}$  M o con una afinidad mayor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-10}$  M o con una afinidad mayor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-11}$  M o con una afinidad mayor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-11}$  M o con una afinidad mayor.

El término "afinidad mayor" hace referencia en la presente documentación a un grado de interacción donde el equilibrio entre el anticuerpo no unido y el globulómero no unido por un lado, y el complejo anticuerpo-globulómero por otro se halla a favor del complejo anticuerpo-globulómero. Del mismo modo, el término "afinidad menor" hace referencia en la presente documentación a un grado de interacción donde el equilibrio entre el anticuerpo no unido y el globulómero no unido por un lado, y el complejo anticuerpo-globulómero por otro se halla a favor del anticuerpo no unido y el globulómero no unido. El término "afinidad mayor" es sinónimo del término "afinidad más alta", y el término "afinidad menor" es sinónimo del término "afinidad más baja".

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con un anticuerpo que se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M, y se une al globulómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (1-42).

Es preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con un anticuerpo que se une al globulómero A $\beta$ (12-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (12-42).

También es preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y

más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).

Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención se unen a al menos un globulómero A $\beta$ , como se definió con anterioridad, y tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulómero de A $\beta$ .

Los anticuerpos de la presente invención que tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulómero de A $\beta$  que por al menos un globulómero A $\beta$  incluyen anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por un monómero A $\beta$ (1-42). Además, es preferible que, como alternativa o adicionalmente, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea mayor que por un monómero A $\beta$ (1-40).

En una realización preferida de la invención, la afinidad del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que su afinidad por los monómeros A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42).

El término "monómero A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en la presente documentación a la forma asilada del péptido A $\beta$ (X-Y), preferiblemente una forma del péptido A $\beta$ (X-Y) que no participa en interacciones esencialmente no covalentes con otros péptidos A $\beta$ . En términos prácticos, el monómero A $\beta$ (X-Y) usualmente se proporciona en forma de una solución acuosa. En una realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de monómero contiene entre 0,05% y 0,2%, más preferiblemente aproximadamente 0,1% de NH<sub>4</sub>OH. En otra realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de monómero contiene entre

0,05% y 0,2%, más preferiblemente aproximadamente 0,1% de NaOH. Cuando se la usa (por ejemplo, para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos de la presente invención), puede ser necesario diluir dicha solución de manera apropiada. Además, usualmente es necesario usar dicha solución 2 horas, en particular 1 hora, y especialmente 30 minutos después de su preparación.

Más específicamente, el término "monómero A $\beta$ (1-40)" hace referencia en la presente documentación a una preparación de monómero A $\beta$ (1-40), como se describe en el ejemplo 2 en la presente documentación, y el término "monómero A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a una preparación de A $\beta$ (1-42), como se describe en el ejemplo 2 en la presente documentación.

En términos prácticos, el anticuerpo de la presente invención se une a uno, o más preferiblemente, a ambos monómeros con una afinidad baja, más preferiblemente, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor, o con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.

Es especialmente preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200



veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por uno, o más preferiblemente, ambos monómeros.

Los anticuerpos de la presente invención que tienen una afinidad comparativamente menor por al menos una forma distinta de globulómero de A $\beta$  que por al menos un globulómero A $\beta$  incluyen además anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por las fibrillas A $\beta$ (1-42). Además, es preferible que, como alternativa o adicionalmente, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea mayor que por las fibrillas A $\beta$ (1-40).

El término "fibrilla" hace referencia en la presente documentación a una estructura molecular que comprende ensamblajes de péptidos A $\beta$ (X-Y) individuales asociados de forma no covalente, que presentan una estructura fibrilar en el microscopio electrónico, que se unen a rojo Congo y luego presentan birrefringencia a la luz polarizada, y cuyo patrón de difracción de rayos X es una estructura  $\beta$  cruzada.

En otro aspecto de la invención, una fibrilla es una estructura molecular que se obtiene con un proceso que comprende la agregación polimérica autoinducida de un péptido A $\beta$  apropiado en ausencia de detergentes, por ejemplo, en HCl 0,1 M, lo que resulta en la formación de agregados de más de 24, preferiblemente más de 100 unidades. Este proceso es bien conocido en la técnica. En la práctica, las fibrillas A $\beta$ (X-Y) se usan en forma de una solución

acuosa. En una realización particularmente preferida de la invención, la solución acuosa de fibrillas se prepara disolviendo el péptido A $\beta$  en NH<sub>4</sub>OH al 0,1%, sometiéndolo a una dilución de 1:4 con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, a lo que sigue el reajuste del pH en 7,4, incubando la solución a 37°C durante 20 horas, a lo que sigue una centrifugación a 10000 G por 10 minutos y una resuspensión en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4.

El término "fibrilla A $\beta$ (X-Y)" hace referencia en la presente documentación a una fibrilla que consiste esencialmente en subunidades A $\beta$ (X-Y), donde es preferible que en promedio al menos 90% de las subunidades sean de tipo A $\beta$ (X-Y), más preferiblemente que al menos 98% de las subunidades sean de tipo A $\beta$ (X-Y), y más preferiblemente que el contenido de péptidos distintos de A $\beta$ (X-Y) sea inferior al umbral de detección.

Más específicamente, el término "fibrilla A $\beta$ (1-42)" hace referencia en la presente documentación a una preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42), como se describe en el ejemplo 3 en la presente documentación.

En la práctica, el anticuerpo de la presente invención se une a una, o más preferiblemente, a ambas fibrillas con baja afinidad, más preferiblemente, con una K<sub>D</sub> de 1x10<sup>-8</sup> M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una K<sub>D</sub> de 3x10<sup>-8</sup> M o con una afinidad menor, con una K<sub>D</sub> de 1x10<sup>-7</sup> M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una K<sub>D</sub> de 3x10<sup>-7</sup> M o con una afinidad menor, o con una K<sub>D</sub> de 1x10<sup>-6</sup> M o con una afinidad menor, por ejemplo, con una K<sub>D</sub> de 3x10<sup>-5</sup> M o con una afinidad menor, o con una K<sub>D</sub> de 1x10<sup>-5</sup> M o con una afinidad menor.

Es especialmente preferible que la afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención por el globulómero A $\beta$ (20-42) sea al menos 2 veces, por

ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por una, o más preferiblemente, ambas fibrillas.

De acuerdo con una realización particular, la invención se relaciona con anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que su afinidad de unión por las fibrillas A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42).

De acuerdo con una realización particularmente preferida, la presente invención se relaciona con anticuerpos que tienen una afinidad comparativamente menor por las formas monoméricas y fibrilares de A $\beta$  que por al menos un globulómero A $\beta$ , en particular, el globulómero A $\beta$ (20-42). Estos anticuerpos se conocen de aquí en adelante como anticuerpos específicos para globulómeros.

Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos que tienen una afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que por un globulómero reticulado A $\beta$ (1-42), en particular, por un globulómero A $\beta$ (1-42) reticulado con glutardialdehído, tal como se describe en el ejemplo 1b en la presente documentación.

En una realización particularmente preferida de la invención, la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 2 veces, por

ejemplo, al menos 3 veces o al menos 5 veces, preferiblemente al menos 10 veces, por ejemplo, al menos 20 veces, al menos 30 veces o al menos 50 veces, más preferiblemente, al menos 100 veces, por ejemplo, al menos 200 veces, al menos 300 veces o al menos 500 veces, y aún más preferiblemente, al menos 1000 veces, por ejemplo, al menos 2000 veces, al menos 3000 veces o al menos 5000 veces, aún más preferiblemente, al menos 10000 veces, por ejemplo, al menos 20000 veces, al menos 30000 o al menos 50000 veces, y más preferiblemente, al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulímero reticulado A $\beta$ (1-42).

Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente están aislados, en particular, son monoclonales, y más particularmente, son recombinantes.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (5F7) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (10F11) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (7C6) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (4B7) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (6A2) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (2F2) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (4D10) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (7E5) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (10C1) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810.

La presente invención también se relaciona con un anticuerpo monoclonal (3B10) que se obtiene a partir de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

Estos anticuerpos de la presente invención, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10, se caracterizan porque tienen una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

La presente invención también se relaciona con anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10. Ha de comprenderse que los anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales no están limitados a los anticuerpos que tienen una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).

Los anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

Todos los anticuerpos monoclonales del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 se unen a un epítopo contenido en el rango de la secuencia A $\beta$  20 y 42, en particular, en el rango de la secuencia A $\beta$  20-30. Sin limitar la invención a una teoría, se cree que dicho epítopo es un epítopo estructural no lineal entre las subunidades en la región de los aminoácidos 20 y 42, en particular, la región de los aminoácidos 20 y 30.

La presente invención también se relaciona con anticuerpos que pueden competir con al menos uno, preferiblemente todos los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

En la presente documentación, el término "anticuerpos competitivos" hace referencia a cualquier cantidad de anticuerpos dirigidos a la misma

entidad molecular o unida de forma estable, pero no covalente, preferiblemente la misma molécula, donde al menos uno es capaz de reducir específicamente la unión mensurable de otro, preferiblemente por medio del impedimento estérico del acceso del otro a su epítopo blanco, o induciendo y/o estabilizando una conformación en la entidad blanco que reduce la afinidad del blanco por el otro anticuerpo, que más preferiblemente bloquea directamente el acceso al otro epítopo blanco mediante la unión a un epítopo que se halla suficientemente cercano al primero, que se superpone con el primero o es idéntico al primero, que más preferiblemente se superpone o es idéntico, que en particular es idéntico. En la presente documentación, se dice que dos epítopos están "superpuestos" si comparten parte de sus estructuras químicas, preferiblemente sus secuencias de aminoácidos, y se dice que son "idénticos" si sus estructuras químicas, preferiblemente sus secuencias de aminoácidos, son idénticas.

Por consiguiente, la presente invención también se relaciona con anticuerpos cuyos epítopos blanco están superpuestos, que preferiblemente son idénticos al epítopo blanco de al menos uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

Por consiguiente, los anticuerpos que tienen un perfil de unión similar al de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 incluyen además anticuerpos que comprenden al menos una porción de la porción de unión a antígeno de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10. Preferiblemente, dicha porción comprende al menos una región de

determinación de la complementariedad (CDR) de cualquiera de dichos anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10.

Por ende, de acuerdo con otra realización particular, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR3 del anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10. Los ejemplos específicos de estos anticuerpos incluyen aquellos que también comprenden la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR2 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR2 del anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10, respectivamente. Aún más específicamente, estos anticuerpos incluyen aquellos que también comprenden la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR1 del anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10, respectivamente.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden una cadena pesada donde el dominio CDR3, CDR2 y/o CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3, CDR2 y/o CDR1 del anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden una cadena liviana donde el dominio CDR3, CDR2 y/o CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR3, CDR2 y/o



CDR1, respectivamente, del anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 97-109 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 98-107 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 20,

los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 98-101 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 38, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 38, y los residuos de aminoácidos 98-109 de SEQ ID N° 38.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende al menos 3 CDR seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias descritas con anterioridad. Más preferiblemente, las 3 CDR seleccionadas son de conjuntos de dominios de CDR variables seleccionados del grupo que consiste en

|                                        |                                                     |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 5F7</b>   |                                                     |
| VH 5F7 CDR-H1                          | TFYIH<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 3              |
| VH 5F7 CDR-H2                          | MIGPGSGNTYYNEMFKD<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 3  |
| VH 5F7 CDR-H3                          | AKSARAAWFAY<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 3       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 5F7</b>   |                                                     |
| VL 5F7 CDR-L1                          | RSSQSVVQSNNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 4 |
| VL 5F7 CDR-L2                          | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 4           |
| VL 5F7 CDR-L3                          | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 4        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 10F11</b> |                                                     |
| VH 10F11 CDR-H1                        | SYVMH<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 7              |
| VH 10F11 CDR-H2                        | YIYPYNDGTYNEKFKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 7   |
| VH 10F11 CDR-H3                        | TVEGATWDGYFDV<br>residuos 97-109 de SEQ ID N° 7     |

|                                        |                                                     |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 10F11</b> |                                                     |
| VL 10F11 CDR-L1                        | KSSQSLLYSKGKTYLN:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 8  |
| VL 10F11 CDR-L2                        | LVS KLDS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 8          |
| VL 10F11 CDR-L3                        | VQGTHFPHT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 8        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 7C6</b>   |                                                     |
| VH 7C6 CDR-H1                          | SYAMS<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 11             |
| VH 7C6 CDR-H2                          | SIHNRGTIFYLDSVKG<br>residuos 50-65 de SEQ ID N° 11  |
| VH 7C6 CDR-H3                          | GRSNSYAMDY<br>residuos 98-107 de SEQ ID N° 11       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 7C6</b>   |                                                     |
| VL 7C6 CDR-L1                          | RSTQTLVHRNGDTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 12 |
| VL 7C6 CDR-L2                          | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 12          |
| VL 7C6 CDR-L3                          | FQGSHVPYT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 12       |

|                              |                                                      |
|------------------------------|------------------------------------------------------|
| Conjunto de CDR<br>de VH 4B7 |                                                      |
| VH 4B7 CDR-H1                | DYEMV<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 15              |
| VH 4B7 CDR-H2                | YISSGSRTIHYADTVKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 15  |
| VH 4B7 CDR-H3                | TLLRLHFDY<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 15         |
| Conjunto de CDR<br>de VL 4B7 |                                                      |
| VL 4B7 CDR-L1                | RSSQSLFYRSNQKNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 16 |
| VL 4B7 CDR-L2                | WASTRES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 16           |
| VL 4B7 CDR-L3                | QQYYSTPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 16        |
| Conjunto de CDR<br>de VH 2F2 |                                                      |
| VH 2F2 CDR-H1                | TFYIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 19             |
| VH 2F2 CDR-H2                | MIGPGSGNTYYNEMFKD<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 19  |
| VH 2F2 CDR-H3                | AKSARAAWFAY<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 19       |

|                                      |                                                      |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 2F2</b> |                                                      |
| VL 2F2 CDR-L1                        | RSSQSVVQSNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 20  |
| VL 2F2 CDR-L2                        | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 20           |
| VL 2F2 CDR-L3                        | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 20        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 6A2</b> |                                                      |
| VH 6A2 CDR-H1                        | TFYIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 23             |
| VH 6A2 CDR-H2                        | MIGPGSGNTYYNEMFKD:<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 23 |
| VH 6A2 CDR-H3                        | AKSHRAAWFAY:<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 23      |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 6A2</b> |                                                      |
| VL 6A2 CDR-L1                        | RSSQSVVQSNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 24  |
| VL 6A2 CDR-L2                        | KVSNRFF:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 24           |
| VL 6A2 CDR-L3                        | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 24        |

|                                       |                                                     |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 4D10</b> |                                                     |
| VH 4D10 CDR-H1                        | SYGVH<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 27             |
| VH 4D10 CDR-H2                        | VIWRGGRIDYNAAFMS<br>residuos 50-65 de SEQ ID N° 27  |
| VH 4D10 CDR-H3                        | NSDV<br>residuos 98-101 de SEQ ID N° 27             |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 4D10</b> |                                                     |
| VL 4D10 CDR-L1                        | KSSQSLLDIDGKTYLN:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 28 |
| VL 4D10 CDR-L2                        | LVSKLDS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 28          |
| VL 4D10 CDR-L3                        | WQGTHFPYT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 28       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 7E5</b>  |                                                     |
| VH 7E5 CDR-H1                         | DYEMV<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 31             |
| VH 7E5 CDR-H2                         | YISSGSRTIHYADTVKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 31 |
| VH 7E5 CDR-H3                         | TLLRLHFDY<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 31        |

|                               |                                                      |
|-------------------------------|------------------------------------------------------|
| Conjunto de CDR<br>de VL 7E5  |                                                      |
| VL 7E5 CDR-L1                 | RSSQSLFYRSNQKNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 32 |
| VL 7E5 CDR-L2                 | WASTRES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 32           |
| VL 7E5 CDR-L3                 | QQYYSTPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 32        |
| Conjunto de CDR<br>de VH 10C1 |                                                      |
| VH 10C1 CDR-H1                | DYEMV<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 35              |
| VH 10C1 CDR-H2                | YINSGSGTIHYADTVKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 35  |
| VH 10C1 CDR-H3                | TLLRLHFDY<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 35         |
| Conjunto de CDR<br>de VL 10C1 |                                                      |
| VL 10C1 CDR-L1                | KSSQSLFYSRNQKNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 36 |
| VL 10C1 CDR-L2                | WASTGES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 36           |
| VL 10C1 CDR-L3                | QQYFSTPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 36        |



|                               |                                                     |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Conjunto de CDR<br>de VH 3B10 |                                                     |
| VH 3B10 CDR-H1                | DYVIH<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 38             |
| VH 3B10 CDR-H2                | YINPYNDGTQYNEKFKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 38 |
| VH 3B10 CDR-H3                | VEGGTWDGYFDV<br>residuos 98-109 de SEQ ID N° 38     |

En una realización, el anticuerpo de la invención comprende al menos dos conjuntos de CDR de dominios variables. Más preferiblemente, los dos conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en el conjunto de CDR de VH 5F7 y el conjunto de CDR de VL 5F7; el conjunto de CDR de VH 10F11 y el conjunto de CDR de VL 10F11; el conjunto de CDR de VH 7C6 y el conjunto de CDR de VL 7C6; el conjunto de CDR de VH 4B7 y el conjunto de CDR de VL 4B7; el conjunto de CDR de VH 2F2 y el conjunto de CDR de VL 2F2; el conjunto de CDR de VH 6A2 y el conjunto de CDR de VL 6A2; el conjunto de CDR de VH 4D10 y el conjunto de CDR de VL 4D10; el conjunto de CDR de VH 7E5 y el conjunto de CDR de VL 7E5; y el conjunto de CDR de VH 10C1 y el conjunto de CDR de VL 10C1.

En otra realización, el anticuerpo descrito con anterioridad comprende además una región de marco aceptora humana.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo con una CDR injertada. Preferiblemente, el anticuerpo con una CDR injertada una o más de las CDR descritas con anterioridad.

Preferiblemente, el anticuerpo con una CDR injertada comprende una región de marco aceptora humana.

En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende una o más de las CDR descritas con anterioridad. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende tres o más de las CDR descritas con anterioridad. Más preferiblemente, el anticuerpo humanizado comprende seis CDR descritas con anterioridad. En una realización particular, las CDR se incorporan en un dominio variable de un anticuerpo humano de una región de marco aceptora humana. Preferiblemente, el dominio variable del anticuerpo humano es un dominio variable humano consenso. Más preferiblemente, la región de marco aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en un residuo clave en la región de marco, donde el residuo clave se selecciona del grupo que consiste en un residuo adyacente a una CDR; a un residuo de un sitio de glicosilación; un residuo raro; un residuo capaz de interactuar con un globulímero A $\beta$ (20-42); un residuo capaz de interactuar con una CDR; un residuo canónico; un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana; un residuo en una zona Vernier; y un residuo en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat. Preferiblemente, la región de marco aceptora humana comprende al menos una sustitución de aminoácidos en la región de marco, donde la secuencia de aminoácidos del marco es al menos 65% idéntica a la secuencia de dicha región de marco aceptora humana y comprende al menos 70 residuos de aminoácidos idénticos a dicha región de marco aceptora humana.

En aún otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos que comprenden la cadena pesada y la cadena liviana, como se definió con anterioridad.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36 y SEQ ID N° 38. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 15 y SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19 y SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 23 y SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31 y SEQ ID N° 32, y SEQ ID N° 35 y SEQ ID N° 36.

En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención comprenden una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE, y las regiones constantes humanas mutantes IgG1 Ala234 Ala235. En particular, los anticuerpos comprenden una región constante humana. Más preferiblemente, los anticuerpos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 39-42. Se prefieren los anticuerpos que comprenden una región constante de la cadena pesada de IgG1.

En otra realización, el anticuerpo está glicosilado. Preferiblemente, el patrón de glicosilación es un patrón de glicosilación humano o un patrón de

glicosilación producido por cualquiera de las células eucariotas descritas en la presente documentación, en particular, células CHO.

La presente invención también se relaciona con una porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención. Estas porciones de unión a antígeno incluyen, sin limitaciones, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv de una cadena sencilla del anticuerpo. Otras porciones de unión a antígeno son los fragmentos Fab', los fragmentos Fv y los fragmentos Fv con enlaces disulfuro.

En la invención también se provee un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente documentación. En otra realización, se provee un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito en la presente documentación. En particular, dicho vector puede seleccionarse del grupo que consiste en pcDNA; pTT (Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, N° 2); pTT3 (pTT con un sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima, S. y Nagata, S., (1990) *Nucleic Acids Research* Vol 18, N° 17); pBV; pJV; y pBJ.

En otro aspecto, una célula hospedera se transforma con el vector descrito en la presente documentación. Preferiblemente, la célula hospedera es una célula procariota. Más preferiblemente, la célula hospedera es *E. coli*. En una realización relacionada, la célula hospedera es una célula eucariota. Preferiblemente, la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula protista, una célula animal (por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto), una célula vegetal y una célula fúngica. Más preferiblemente, la célula hospedera es una célula de mamífero, incluyendo, sin limitaciones, CHO y COS; o una célula fúngica, por ejemplo,

una célula de levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*; o una célula de insecto, tal como Sf9.

En otro aspecto de la invención, se provee un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar cualquiera de las células huésped, o un hibridoma descrito en la presente documentación, en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir el anticuerpo. En otra realización, se provee un anticuerpo que se obtiene con el método descrito en la presente documentación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse de una manera conocida per se.

Los linfocitos B, que en total contienen un repertorio de anticuerpos compuesto por cientos de miles de millones de anticuerpos con distintas especificidades, son una parte del sistema inmune de los mamíferos. Una respuesta inmune normal ante un antígeno particular implica la selección de uno o más anticuerpos de dicho repertorio, donde estos anticuerpos se unen específicamente a dicho antígeno, y el éxito de una respuesta inmune se basa al menos en parte en la capacidad de dichos anticuerpos de reconocer específicamente (y finalmente eliminar) el antígeno estimulador, y de ignorar otras moléculas en el ambiente de dichos anticuerpos.

La utilidad de los anticuerpos que reconocen específicamente un antígeno blanco particular ha conducido al desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales. En la actualidad, la tecnología estandarizada de hibridomas permite producir anticuerpos con una especificidad única por un antígeno de interés. Más recientemente se han desarrollado técnicas relacionadas con anticuerpos recombinantes, tales como el análisis in vitro de

Además, la presente invención se relaciona con un hibridoma que es capaz de producir (secretar) un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Los hibridomas de la presente invención incluyen aquellos a los que se les asignaron los números de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo seleccionados del grupo que consiste en PTA-7241, PTA-7239, PTA-7240, PTA-7242, PTA-7408, PTA-7409, PTA-7405, PTA-7809, PTA-7810 y PTA-7851.

Vale destacar que los anticuerpos de la presente invención también pueden reaccionar, es decir, pueden unirse a formas de A $\beta$  distintas de los globulómeros A $\beta$  descritos en la presente documentación. Estos antígenos pueden ser oligoméricos o globuloméricos, o no. Por ende, los antígenos con los cuales se unen los anticuerpos de la presente invención incluyen cualquier forma de A $\beta$  que comprende el epítopo del globulómero con la cual reaccionan los anticuerpos de la presente invención. Estas formas de A $\beta$  incluyen formas A $\beta$ (X-Y) truncadas y no truncadas (donde X e Y se definen como se describió con anterioridad), tales como las formas A $\beta$ (20-42), A $\beta$ (20-40), A $\beta$ (12-42), A $\beta$ (12-40), A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40), siempre que dichas forma comprendan el epítopo del globulómero.

La presente invención también se relaciona con una composición que comprende un anticuerpo de la invención o una porción de unión a antígeno de éste, como se definió con anterioridad.

De acuerdo con una realización particular, dicha composición es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención o la porción de unión a antígeno de éste, y un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.

El anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno definida con anterioridad, preferiblemente es capaz de neutralizar, tanto in vitro como in vivo, la actividad del globulómero A $\beta$  o el derivado de éste al cual se une. Por lo tanto, dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno puede usarse para inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de éste, por ejemplo, en una preparación que contiene dicho globulómero o derivado de éste, o en individuos humanos u otros mamíferos donde esté presente dicho globulómero o derivado de éste.

De acuerdo con una realización, la invención se relaciona con un método para inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de éste, donde el método comprende permitir que un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de éste, actúe con un globulómero o un derivado de éste, con el fin de inhibir la actividad de dicho globulómero o el derivado de éste. Dicha actividad puede inhibirse, por ejemplo, in vitro. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno, puede agregarse a una preparación, tal como una muestra derivada de un sujeto o un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene dicho globulómero o derivado de éste, con el fin de inhibir la actividad de dicho globulómero o derivado de éste en dicha muestra. Como alternativa, la actividad del globulómero o el derivado de éste puede inhibirse en un individuo in vivo.

Por consiguiente, la presente invención se relaciona además con el uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno, como se definió con anterioridad, para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, una amiloidosis seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer y la amiloidosis del síndrome de

Down. Por ende, un aspecto de dicho uso de la invención es un método para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad. El uso de dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno para tratar y especialmente prevenir la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, es particularmente útil para la inmunización pasiva. Por lo tanto, en el método para tratar o prevenir una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto que lo necesita, un propósito de la administración del anticuerpo o la porción de unión a antígeno al sujeto es la inmunización pasiva del sujeto contra la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down.

El anticuerpo de la invención o la porción de unión a antígeno, como se definió con anterioridad, preferiblemente permite detectar, tanto in vitro como in vivo, un globulómero A $\beta$  o un derivado de éste, con el que se une. Por ende, dicho anticuerpo o dicha porción de unión a antígeno puede usarse para detectar dicho globulómero o un derivado de éste, por ejemplo, en una preparación que contiene dicho globulómero o un derivado de éste, o en individuos humanos u otros mamíferos donde esté presente dicho globulómero, o derivados de éste.

De acuerdo con una realización, la invención se relaciona con un método para detectar dicho globulómero o un derivado de éste, donde el método comprende permitir que un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de éste, actúe con un globulómero o un derivado de éste, con el fin de



unir dicho globulómero, o un derivado de éste (y en consecuencia, preferiblemente formar un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno de éste, y el globulómero o el derivado de éste). Por ejemplo, dicho globulómero puede detectarse in vitro. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención, o la porción de unión a antígeno, puede agregarse a una preparación, por ejemplo, una muestra derivada de un sujeto, o un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene dicho globulómero o un derivado de éste, con el objeto de detectar dicho globulómero o un derivado de éste en dicha preparación. Como alternativa, el globulómero o el derivado de éste pueden detectarse en un individuo in vivo.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona además con el uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad para preparar una composición para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down. Un aspecto de dicho uso de la invención es un método para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto del que se sospecha que tiene la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, que comprende administrarle al sujeto un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con el antígeno, donde la presencia del complejo indica la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en el sujeto. Un segundo aspecto de dicho uso de la invención es un método para diagnosticar una amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la

amiloidosis del síndrome de Down, en un sujeto del que se sospecha que tiene la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, que comprende proporcionar una muestra del sujeto, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se definió con anterioridad, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con el antígeno, donde la presencia del complejo indica la amiloidosis, en particular, la enfermedad de Alzheimer o la amiloidosis del síndrome de Down, en el sujeto.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Las afinidades de unión de los anticuerpos de la invención pueden evaluarse usando inmunizados estandarizados in vitro, tales como análisis de ELISA, transferencia puntual o BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para hallar descripciones, véanse Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

De acuerdo con una realización particular, las afinidades definidas en la presente documentación hacen referencia a los valores obtenidos llevando a cabo una transferencia puntual, como se describe en el ejemplo 8, y evaluándolo por densitometría. De acuerdo con una realización particular de la invención, la determinación de la afinidad de unión por transferencia puntual comprende lo siguiente: se transfiere una cantidad determinada del antígeno (por ejemplo, el globulómero A $\beta$ (X-Y), el monómero A $\beta$ (X-Y) o las fibrillas A $\beta$ (X-Y), como se definió con anterioridad), o en la práctica, una dilución apropiada de éste, por ejemplo, en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de

BSA, a una concentración de antígeno, por ejemplo, de 100 pmol/ $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l, 1 pmol/ $\mu$ l, 0,1 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l, en una membrana de nitrocelulosa, luego la membrana se bloquea con leche para prevenir la unión no específica y se lavan luego se la pone en contacto con el anticuerpo de interés, a lo que sigue la detección de este último por medio de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima y una reacción colorimétrica; a concentraciones de anticuerpos definidas, donde la cantidad de anticuerpo unido permite determinar la afinidad. Por ende, la afinidad relativa de los dos anticuerpos diferentes por un blanco, o de un anticuerpo por dos blancos diferentes, se define en la presente documentación como la relación de las cantidades respectivas del anticuerpo unido al blanco, observadas con las dos combinaciones de anticuerpo-blanco, bajo condiciones de transferencia puntual idénticas en el resto de los aspectos. A diferencia de un abordaje similar basado en Western blot, el abordaje de transferencia puntual permite determinar la afinidad de un anticuerpo por un blanco dado en su conformación natural; a diferencia del abordaje de ELISA, el abordaje de transferencia puntual no sufre diferencias en las afinidades entre los distintos blancos y la matriz, por lo que permite realizar comparaciones más precisas entre distintos blancos.

El término " $K_D$ ", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, que es conocida en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente son anticuerpos aislados. Un "anticuerpo aislado" hace referencia a un anticuerpo que tiene las afinidades de unión descritas con anterioridad, y que está

esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen distintas afinidades de unión. El término "esencialmente libre" hace referencia en la presente documentación a una preparación de anticuerpos donde al menos 95% de los anticuerpos, preferiblemente al menos 98% de los anticuerpos, y más preferiblemente, al menos 99% de los anticuerpos tienen la afinidad de unión deseada. Más aún, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Los anticuerpos aislados de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales. Un "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo, anticuerpos que comparten una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena en común, en contraste con las preparaciones de anticuerpos "policlonales", que contienen una mezcla de anticuerpos con secuencias de aminoácidos diferentes. Los anticuerpos monoclonales pueden generarse con diversas tecnologías, tales como fagos, bacterias, levaduras o presentaciones ribosómicas, y también con métodos clásicos, por ejemplo, anticuerpos derivados de hibridomas (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado con tecnología de hibridomas, tal como la metodología de hibridomas de Kohler y Milstein ((1975) Nature 256:495-497). Por lo tanto, un anticuerpo no derivado de un hibridoma con una secuencia uniforme aún se conoce como anticuerpo monoclonal en la presente documentación, aunque haya sido obtenido con metodologías no clásicas, y el término "monoclonal" no se restringe a los anticuerpos derivados de hibridomas, sino que se usa para hacer referencia a todos los derivados de un clon de ácidos nucleicos.

111

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos recombinantes. En la presente documentación, el término "recombinante" hace referencia cualquier combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados, por ejemplo, por síntesis química o mediante la manipulación de segmentos de ácidos nucleicos aislados con técnicas de ingeniería genética. En particular, el término "anticuerpos recombinante" hace referencia a anticuerpos que se producen, se expresan, se generan o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedera; anticuerpos aislados a partir de una biblioteca anticuerpos recombinantes; anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico debido a la presencia de genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295); o anticuerpos que se producen, se expresan, se generan o se aíslan de cualquier otro modo, donde se ensamblan secuencias de inmunoglobulina particulares (tales como secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas) con otras secuencias de ADN. Los anticuerpos recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, con CDR injertadas y humanizados. Aquél entrenado en la técnica ha de saber que la expresión de un anticuerpo monoclonal convencional derivado de un hibridoma en un sistema heterogéneo requerirá la generación de un anticuerpos recombinante, aún si la secuencia de aminoácidos de la proteína del anticuerpo resultante no cambia, o no se desea cambiarla.

En una realización particular de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

De acuerdo con una multiplicidad de realizaciones, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos derivada completamente de una sola especie, tal como un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. De acuerdo con otras realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo con CDR injertadas, u otra forma de anticuerpo humanizado.

El término "anticuerpo" hace referencia a moléculas de inmunoglobulina que consisten en 4 cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). Las cadenas comúnmente están conectadas unas con otras a través de enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de dicha cadena pesada (abreviada en la presente documentación como HCVR o VH) y una región constante de dicha cadena pesada. La región constante de la cadena pesada consiste en tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de dicha cadena liviana (abreviada en la presente documentación como LCVR o VL) y una región constante de dicha cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones hipervariables, conocidas como regiones de determinación de la complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco (FR). Por consiguiente, cada región VH y VL consiste en tres CDR y cuatro FR, que están dispuestas entre el extremo N y el extremo C en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Esta estructura es bien conocida por aquellos entrenados en la técnica.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo de la invención, donde dichos fragmentos aún tienen las afinidades de unión definidas con anterioridad. Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden cumplir la función de unión a antígeno de un anticuerpo. De acuerdo con el término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, los ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente compuesto por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, es decir, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd compuesto por los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv compuesto por los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH o de VH, CH1, CH2, DH3, o VH, CH2, CH3; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, a saber, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden conectarse uno con otro usando un conector sintético, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos poli-G<sub>4</sub>S, y métodos recombinantes, lo que permite prepararlos como una proteína de una cadena sencilla, donde se combinan las regiones VL y VH para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una cadena sencilla (ScFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo también abarca estos anticuerpos de una cadena sencilla. Del mismo modo, otras formas de

anticuerpos de una cadena sencilla, tales como los "diacuerpos", también están incluidas en la presente documentación. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una cadena sencilla de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, que lo que se fuerza el apareamiento de dichos dominios con dominios complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina hace referencia a un dominio constante de la cadena pesada o liviana. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena liviana de la IgG humana son conocidas en la técnica y se representan en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia del dominio constante de la cadena pesada y el dominio constante de la cadena liviana de la IgG humana

| Proteína            | ID           | de | la | Secuencia                     |
|---------------------|--------------|----|----|-------------------------------|
|                     |              |    |    | secuencia                     |
|                     |              |    |    | 12345678901234567890123456789 |
|                     |              |    |    | 012                           |
| región constante Ig | SEQ ID N° 39 |    |    | ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAA      |
| gamma-1             |              |    |    | LGCLVKDY                      |
|                     |              |    |    | FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV      |
|                     |              |    |    | LQSSGLYS                      |
|                     |              |    |    | LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP     |
|                     |              |    |    | SNTKVDK                       |



región      constante    SEQ ID Nº 40  
mutante Ig gamma-  
1

KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM  
HEALHNHYT  
QKSLSLSPGK  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDY  
FPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAV  
LQSSGLYS  
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP  
SNTKVDK  
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG  
GPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE  
DPEVKFNW

región constante Ig    SEQ ID N° 41  
Kappa

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFY  
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYT  
QKSLSLSPGK  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV  
CLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDST  
YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQGLSSP  
VTKSFNRGEC  
QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT  
LVCLISDF  
YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT  
PSKQSNK  
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ  
VTHEGSTVE  
KTVAPTECS

región constante Ig    SEQ ID N° 42  
Lambda

Además, un anticuerpo de la presente invención, o una porción de unión a antígeno de éste, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente de dicho anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales. Para dichas moléculas de inmunoadhesión, es relevante el uso de la región principal de la estreptavidina en la preparación de una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidinilo C-terminal, por ejemplo, hexahistidinilo, en la producción de moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

El término "anticuerpo humano" hace referencia a anticuerpos cuyas regiones variable y constante corresponden o derivan de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana, como se describe, por ejemplo, en Kabat *et al.* (véase Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Sin embargo, los anticuerpos humanos de la invención pueden contener residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones que han sido introducidas por mutagénesis al azar o con especificidad de sitio *in vitro*, o por mutaciones somáticas *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular, en CDR3. Los anticuerpos humanos recombinantes de la invención tienen regiones variables, y también pueden contener regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991)

*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242). Sin embargo, de acuerdo con realizaciones particulares, estos anticuerpos humanos recombinantes están sometidos a mutagénesis in vitro (o a mutagénesis somáticas in vivo, si se usa un animal que es transgénico debido a secuencias de Ig humanas), por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque están relacionadas o derivan de secuencias VH y VL de la línea germinal humana, no existen naturalmente in vivo en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana. De acuerdo con realizaciones particulares, los anticuerpos recombinantes de este tipo son el resultado de mutagénesis selectiva o retromutación, o ambas. Preferiblemente, la mutagénesis resulta en una afinidad por el blanco que es mayor, y/o una afinidad por estructuras distintas del blanco que es menor que la del anticuerpo progenitor.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie, y secuencias de la región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas pesada y liviana unidas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo con una CDR injertada" hace referencia a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de las cadenas pesada y liviana de una especie, pero cuyas secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL han sido reemplazadas por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de las cadenas

pesada y liviana murinas, donde una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas por secuencias CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" hace referencia a anticuerpos que contienen secuencias de la región variable de las cadenas pesada y liviana de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, pollo, camélidos, ovejas o cabras), pero donde al menos una parte de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para que sean más "similares a humanos", es decir, para que sean más similares a las secuencias variables de la línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo con una CDR injertada donde las secuencias CDR humanas han sido insertadas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "nomenclatura de Kabat" se usan indistintamente en la presente documentación. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, hacen referencia a un sistema para numerar los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno de éste (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391, y Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 31 a 35 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 65 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena liviana, la región

hipervariable se extiende entre las posiciones de los aminoácidos 24 a 34 para CDR1, entre las posiciones de los aminoácidos 50 a 56 para CDR2, y entre las posiciones de los aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se los usa en la presente documentación, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" hacen referencia al anticuerpo o la secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. En algunas realizaciones, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica las regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" hace referencia a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una o más de las regiones de marco y las regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" hace referencia a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones de marco. De acuerdo con esta realización, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 10 residuos de aminoácidos que no aparecen en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de marco aceptora y/o una región constante aceptora, por ejemplo, puede derivar o puede obtenerse a partir de un anticuerpo de la línea germinal, un gen de un anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpos en desarrollo, o anticuerpos disponibles comercialmente).

Como se lo usa en la presente documentación, el término "CDR" hace referencia a la región de determinación de la complementariedad dentro de las secuencias variables de un anticuerpo. Para cada una de las regiones variables, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena liviana, que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. El término "conjunto de CDR", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un grupo de tres CDR que aparecen en una sola región variable y permiten la unión al antígeno. Los límites exactos de estas CDR han sido definidos en distintos términos de acuerdo con distintos sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente provee un sistema de numeración no ambiguo de los residuos que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también provee límites precisos para los residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR Kabat. Chotia y sus colegas (Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chotia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) descubrieron que determinadas sub-porciones dentro de las CDR Kabat adoptan conformaciones casi idénticas del esqueleto peptídico, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se denominaron L1, L2 y L3, o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" hacen referencia a las regiones de la cadena liviana y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR Chotia, y tienen límites que se superponen con las CDR Kabat. Otros límites que definen CDR que se superponen con las CDR de Kabat han sido descritos por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)).

Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero aún así se superponen con las CDR Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de las predicciones o los descubrimientos experimentales de residuos o grupos de residuos particular, o aún CDR completas, que no afectan significativamente la unión al antígeno. En los métodos usados en la presente documentación pueden emplearse CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque en realizaciones preferidas se usan CDR definidas de acuerdo con Kabat o Chotia.

Como se lo usa en la presente documentación, el término residuo "canónico" hace referencia a un residuo en una CDR o un marco que define una estructura canónica de CDR particular, como lo definen Chotia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chotia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), ambos incorporados en la presente documentación a modo de referencia). De acuerdo con Chotia et al., las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones del esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de su gran diversidad a nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión del esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un rizo.

Como se los usa en la presente documentación, los términos "donante" y "anticuerpo donante" hacen referencia a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo donante es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones de marco. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término



"anticuerpo donante" hace referencia a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco" o "secuencia de marco" hace referencia a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Como la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse usando distintos sistemas, el significado de una secuencia de marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, L2 y L3 de la cadena liviana, y CDR-H1, H2 y H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena liviana y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, donde CDR1 está localizada entre FR1 y FR2, CDR2 está localizada entre FR2 y FR3, y CDR3 está localizada entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, tal como la han definido otros, representa las FR combinadas en la región variable de una cadena sencilla de inmunoglobulina de ocurrencia natural. Como se la usa en la presente documentación, una FR representa una de las cuatro sub-regiones, y las FR representan dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

Las secuencias aceptoras de la cadena pesada y la cadena liviana humana son conocidas en la técnica.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "gen de anticuerpo de la línea germinal" o "fragmento de gen" hace referencia a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han pasado por el proceso de maduración que resulta en la redistribución genética y la mutación para expresar una inmunoglobulina particular (véanse, por ejemplo,

Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por las diversas realizaciones de la presente invención deriva del descubrimiento de que los genes de anticuerpos de la línea germinal tienen mayores probabilidades que los genes de genes maduros de conservar estructuras esenciales en su secuencia de aminoácidos que son propias de los individuos de la especie, por lo que es menos probable que no sean reconocidos como propios cuando se los use en dicha especie.

Como se lo usa en la presente documentación, el término residuos "clave" hace referencia a determinados residuos dentro de la región variable que tienen un impacto mayor sobre la especificidad y/o la afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, sin limitaciones, uno o más de los siguientes: un residuo que se halla adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (que puede ser un sitio de N u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, un residuo en la zona de Vernier, y un residuo en una región donde se superpone una CDR1 de cadena pesada definida por Chotia y un marco de la primera cadena pesada definida por Kabat.

Como se lo usa en la presente documentación, el término "anticuerpo humanizado" hace referencia específicamente a un anticuerpo, o una variante, un derivado, un análogo o un fragmento de éste que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de interés, y que comprende una región de marco (FR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un

anticuerpo humano y una región de determinación de la complementariedad (CDR) que sustancialmente tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se lo usa en la presente documentación, el término "sustancialmente", en el contexto de una CDR, hace referencia a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado sustancialmente comprende la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones de marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o una cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier subclase, incluyendo, sin limitaciones, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

No es necesario que las regiones de marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias progenitoras; por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso puede haber sido mutada mediante la sustitución, la inserción y/o la supresión de al menos un residuo de aminoácido, de modo que el residuo de la CDR o el marco en dicho sitio no corresponde exactamente al anticuerpo donante o al marco consenso. Sin embargo, en una realización preferida, estas mutaciones no son extensas. Comúnmente, al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente, al menos 90%, y más preferiblemente, al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de las FR y CDR progenitoras. Como se lo usa en la presente documentación, el término "marco consenso " hace referencia a la región de marco en la secuencia de la inmunoglobulina consenso. Como se lo usa en la presente documentación, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" hace referencia a la secuencia formada con los aminoácidos de ocurrencia más frecuente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1987)). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con mayor frecuencia en dicha posición en la familia. Cuando dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

Como se la usa en la presente documentación, la zona "Vernier" hace referencia a un subconjunto de residuos del marco que pueden ajustar la estructura de la CDR y ajustarla con precisión para que se una al antígeno como, lo describen Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia). Los residuos de la zona Vernier forman una capa que queda debajo de las CDR, y pueden afectar la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

El término "epitope" incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, los epitopes determinantes incluyen agrupaciones superficiales de moléculas con actividad química, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos o sulfonilos, y en determinadas realizaciones, pueden tener características específicas en su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epitope es una región de un antígeno donde se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "polinucleótido", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena simple y doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble.

El término "polinucleótido aislado", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un polinucleótido (por ejemplo, genómico, de ADNc o de origen sintético, o cualquier combinación de éstos) que, en virtud de

su origen, no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido con el que normalmente se halla asociado en la naturaleza; que está unido operativamente a un polinucleótido con el que normalmente no se halla unido en la naturaleza; o que no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "vector", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que está unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un ADN circular de cadena doble con el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, que permite unir segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en la célula hospedera en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedera al introducirse en ella, por lo que se replican junto con el genoma del huésped. Más aún, determinados vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente. Estos vectores se conocen en la presente documentación como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles para los protocolos de ADN recombinante comúnmente toman la forma de plásmidos. En esta solicitud, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector de uso más común. Sin embargo, en la invención han de incluirse otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo,

retrovirus con replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

El término "unido operativamente" hace referencia a una yuxtaposición donde los componentes descritos se hallan en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está conectada de modo tal que la expresión de la secuencia codificante se obtiene bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias de control de la expresión que se hallan contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para obtener la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están unidas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas para el inicio de la transcripción, la terminación, secuencias promotoras y potenciadoras; señales eficaces para el procesamiento del ARN, tales como secuencias de separación y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se lo desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de estas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, estas secuencias de control generalmente incluyen promotores, sitios de unión a ribosomas y secuencias de terminación de la transcripción. En eucariotas, en general, estas

secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directrices y secuencias que son asociados de fusión

La "transformación", como se la define en la presente documentación, hace referencia a cualquier proceso con el cual el ADN exógeno ingresa en una célula hospedera. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales, usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para insertar secuencias de ácidos nucleicos extrañas en células huésped procariontas o eucariontas. El método se selecciona sobre la base de la célula hospedera a transformar, y puede incluir, sin limitaciones, la infección viral, la electroporación, la lipofección y el bombardeo de partículas. Estas células "transformadas" incluyen células transformadas de forma estable, donde el ADN insertado puede replicarse como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma del huésped. También incluyen células que expresan de forma transitoria el ADN o el ARN insertado por períodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a la célula en la que se introduce ADN exógeno. Ha de comprenderse que estos términos no solamente hacen referencia a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Como es posible que ocurran modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o



influencias ambientales, de hecho, esta progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluye dentro del término "célula hospedera", tal como se lo usa en la presente documentación. Preferiblemente, las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas entre cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células huésped incluyen, sin limitaciones, células procariotas de la línea de *E. coli*; las líneas de células de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Es posible usar procedimientos convencionales para producir ADN recombinante, sintetizar oligonucleótidos y cultivar y transformar tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y los procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, de maneras conocidas en la técnica o como se describe en la presente documentación. Los protocolos y los procedimientos pueden llevarse a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se describen en esta memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora en la presente documentación a modo de referencia para cualquier propósito.

Un "organismo transgénico", como es conocido en la técnica y como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a un organismo que tiene células que contienen un transgen, donde el transgen introducido en el

organismo (o cualquier ancestro del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgen" es una construcción de ADN que se integra de forma estable y operativa en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un organismo transgénico, donde dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos celulares o tejidos del organismo transgénico.

A continuación se describen métodos para producir los anticuerpos de la invención. Se hace una distinción entre los abordajes in vivo, los abordajes in vitro o las combinaciones de ambos.

A continuación se describen algunos métodos para producir los anticuerpos de la invención. Se hace una distinción entre los abordajes in vivo, los abordajes in vitro o las combinaciones de ambos.

#### **Abordajes in vivo**

Dependiendo del tipo de anticuerpo deseado, pueden usarse diversos animales huésped para la inmunización in vivo. Puede usarse un huésped que expresa una versión endógena del antígeno de interés. Como alternativa, es posible usar un huésped en el que se ha introducido una deficiencia en una versión endógena del antígeno de interés. Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones en los que se ha introducido una deficiencia de una proteína endógena particular por recombinación homóloga en el gen endógeno correspondiente (es decir, ratones sometidos a knockout) generan una respuesta humoral a la proteína con la que han sido inmunizados, por lo que pueden usarse para la producción de anticuerpos monoclonales de alta afinidad por la proteína (véase, por ejemplo, Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Métodos* 183:231-237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Una multiplicidad de mamíferos no humanos son apropiados para la producir los anticuerpos no humanos de acuerdo con la invención. Dichos animales incluyen ratones, ratas, pollos, camélidos, conejos, ovejas y cabras (y versiones de éstos sometidas a knockout), aunque para la producción de hibridomas se prefieren los ratones. Además, un animal huésped no humano que expresa un repertorio de anticuerpos humanos puede usarse para producir anticuerpos esencialmente humanos contra un antígeno humano con especificidad doble. Los animales no humanos de este tipo incluyen animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que contienen transgenes de inmunoglobulina humana (ratones quiméricos hu-PBMC SCID) y quimeras de irradiación de humano/ratón, que se describirán con mayor detalle más adelante.

De acuerdo con una realización, el animal inmunizado con el globulímero A $\beta$ (20-42) o el derivado de éste es un mamífero no humano, preferiblemente un ratón, que es transgénico debido a la presencia de genes de inmunoglobulina humana, de modo que dicho mamífero no humano produce anticuerpos humanos al ser estimulado con antígenos. Típicamente, los transgenes de las cadenas pesada y liviana de la inmunoglobulina con la configuración de la línea germinal humana se introducen en animales que han sido alterados, de modo que sus loci endógenos de las cadenas pesada y liviana están inactivos. Si estos animales se estimulan con un antígeno (por ejemplo, con un antígeno humano), se producen anticuerpos derivados de las secuencias de inmunoglobulina humana (anticuerpos humanos). Es posible producir anticuerpos humanos monoclonales a partir de los linfocitos de dichos animales, por medio de una tecnología estandarizada de hibridomas. Para

hallar una descripción más detallada de ratones transgénicos con inmunoglobulinas humanas y su uso en la producción de anticuerpos humanos, véanse, por ejemplo, US 5939598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 y WO 99/53049 (Abgenix Inc.), y US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, US 5814318, US 5877397 y WO 99/45962 (Genpharm Inc.); véanse también MacQuitty, J.J. y Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. M. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. y Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X.D. *et al.* (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

De acuerdo con otra realización, el animal que se inmuniza con el globulómero A $\beta$ (20-42) o el derivado de éste puede ser un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que ha sido reconstituido con células mononucleares de sangre periférica humana, células linfoides o precursores de éstas. Estos ratones, que se conocen como ratones hu-PBMC quiméricos, producen inmunoglobulina humana en respuesta a los estímulos con antígenos, tal como se ha demostrado. Para hallar una descripción más detallada de estos ratones y su uso en la generación de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Leader, K.A. *et al.* (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. *et al.* (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W.J. *et al.* (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. *et al.* (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-

152; Albert, S.E. *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:1393-1403; Nguyen, H. *et al.* (1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Arai, K. *et al.* (1998) *J. Immunol. Métodos* 217:79-85; Yoshinari, K. y Arai, K. (1998) *Hibridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. *et al.* (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. *et al.* (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smithson, S.L. *et al.* (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; Chamat, S. *et al.* (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; y Heard, C. *et al.* (1999) *Molec. Med.* 5:35-45.

De acuerdo con otra realización, el animal que ha sido inmunizado con el globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste es un ratón que ha sido tratado con una dosis letal de irradiación corporal total, que luego ha sido protegido de la radiación con células de médula ósea de un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), y que posteriormente ha sido transplantado con linfocitos humanos funcionales. Este tipo de quimera, conocida como el sistema Trimer, se usa para producir anticuerpos humanos monoclonales mediante la inmunización de dichos ratones con el antígeno de interés, a lo que sigue la producción de los anticuerpos monoclonales usando tecnología estandarizada de hibridomas. Para hallar una descripción más detallada de estos ratones y su uso en la generación de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y y Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; y Bocher, W.O. *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

Comenzando con las células productoras de anticuerpos generadas in vivo, es posible producir anticuerpos monoclonales con técnicas estandarizadas, tales como la técnica de hibridomas descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (véanse también Brown *et al.*

(1981) *J. Immunol* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J Biol Chem* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). Esta tecnología para producir hibridomas con anticuerpos monoclonales es suficientemente conocidas (véanse en general R. H. Kenneth, en *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); E. A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231-36). Brevemente, se fusiona una línea de células inmortalizadas (típicamente un mieloma) con linfocitos (típicamente esplenocitos, células de nodos linfáticos o linfocitos de sangre periférica) de un mamífero inmunizado con el globulímero A $\beta$  de la invención o un derivado de éste, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se analizan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Para este propósito, puede aplicarse cualquier protocolo bien conocido para fusionar linfocitos y líneas de células inmortalizadas (véanse también G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, citado con anterioridad; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado con anterioridad). Más aún, aquél entrenado en la técnica ha de apreciar que hay diversas variaciones de dichos métodos que son igualmente útiles. Típicamente, la línea de células inmortalizadas (por ejemplo, una línea de células de mieloma) deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, es posible establecer hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la invención con una línea de células inmortalizadas de ratón. Las líneas de células inmortalizadas preferidas son líneas de células de mieloma de ratón que son

sensibles a un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT). Es posible usar cualquiera de una cantidad de líneas de células de mieloma como asociado de fusión por omisión, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de células de mieloma están disponibles en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC), Rockville, MD. Típicamente se fusionan células de mieloma de ratón sensibles a HAT con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol (PEG). Después, las células de hibridomas que resultan de la fusión se seleccionan usando un medio HAT, con lo que se matan las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de forma no productiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de unos pocos días porque no han sido transformados). Las células de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la invención se identifican analizando los sobrenadantes de cultivo de hibridomas en busca de dichos anticuerpos, por ejemplo, usando un ensayo de transferencia puntual, como se describió con anterioridad y como se describirá en el ejemplo 8, con el objeto de seleccionar aquellos anticuerpos que tienen las afinidades de unión definidas con anterioridad.

Los anticuerpos monoclonales 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 y 3B10 fueron generados usando el abordaje in vivo descrito con anterioridad, y se obtuvieron a partir de un hibridoma como se definió en la presente documentación.

Del mismo modo, dicho hibridoma puede usarse como fuente de ácidos nucleicos que codifican cadenas livianas y/o pesadas para producir los

anticuerpos de la presente invención por medios recombinantes, como se describirá con mayor detalle más adelante.

### **Abordajes in vitro**

Como alternativa a la producción de los anticuerpos de la invención por inmunización y selección, los anticuerpos de la invención pueden identificarse y aislarse analizando bibliotecas de combinación de inmunoglobulinas recombinantes con el globulímero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste, de manera de aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que tienen la afinidad de unión requerida. Los conjuntos de elementos para generar y analizar bibliotecas de presentación están disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema de anticuerpos y fagos recombinantes de Pharmacia, N° de catálogo 27-9400-01; y el conjunto de elementos de presentación de fagos Stratagene SurfZAP<sup>®</sup>, N° de catálogo 240612). En muchas realizaciones, la biblioteca de presentación es una biblioteca de scFv o una biblioteca de Fab. La técnica de presentación de fagos para analizar bibliotecas de anticuerpos recombinantes ha sido descripta apropiadamente. Los ejemplos de métodos y compuestos que pueden usarse de una forma particularmente ventajosa para generar y analizar bibliotecas de presentación de anticuerpos pueden hallarse, por ejemplo, en McCafferty *et al.* WO 92/01047, US 5969108 y EP 589 877 (donde se describen en particular las presentaciones de scFv), Ladner *et al.* US 5223409, US 5403484, US 5571698, US 5837500 y EP 436 597 (donde se describe la fusión pIII, por ejemplo); Dower *et al.* WO 91/17271, US 5427908, US 5580717 y EP 527 839 (donde se describen en particular presentaciones de Fab); Winter *et al.* Publicación Internacional WO 92/20791 y EP 368,684 (donde se describe en particular la clonación de secuencias de dominios variables de



inmunoglobulinas); Griffiths *et al.* US 5885793 y EP 589 877 (donde se describe en particular el aislamiento de anticuerpos humanos para antígenos humanos usando bibliotecas recombinantes); Garrard *et al.* WO 92/09690 (donde se describen en particular las técnicas de presentación de fagos); Knappik *et al.* WO 97/08320 (donde se describe la biblioteca de anticuerpos recombinantes humanos HuCal); Salfeld *et al.* WO 97/29131 (donde se describe la producción de un anticuerpo humano recombinante para un antígeno humano (factor de necrosis tumoral alfa), y también la maduración *in vitro* por afinidad del anticuerpos recombinante); y Salfeld *et al.* Solicitud Provisoria de los EEUU N° 60/126603 y las solicitudes de patentes basadas en ella (donde también se describe la producción de anticuerpos humanos recombinantes contra antígenos humanos (interleuquina-12 humana), y también la maduración *in vitro* por afinidad del anticuerpos recombinante).

Pueden hallarse descripciones adicionales de análisis de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en publicaciones científicas tales como Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554; y Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

Como alternativa al uso de sistemas de presentación de bacteriófagos, pueden expresarse bibliotecas de anticuerpos recombinantes en la superficie

de células de levadura o células bacterianas. En WO 99/36569 se describen métodos para preparar y analizar bibliotecas expresadas en la superficie de células de levadura. En WO 98/49286 se describen con mayor detalle métodos para preparar y analizar bibliotecas expresadas sobre la superficie de células bacterianas.

En todos los abordajes in vitro, un método de selección para incrementar el contenido de anticuerpos recombinantes con las propiedades deseadas constituye una parte importante del proceso, donde dicho método generalmente se conoce como "enriquecimiento" y comúnmente toma la forma de una cromatografía de afinidad sobre columnas en cuya matriz se ha unido la estructura blanco. Después, las moléculas blanco prometedoras se someten a la determinación individual de sus afinidades absolutas y/o relativas, preferiblemente por medio de un ensayo de transferencia puntual estandarizado, como se describió con anterioridad y como se describirá en el ejemplo 8.

Una vez que un anticuerpo de interés de una biblioteca de combinación ha sido identificado y caracterizado en un grado suficiente, las secuencias de ADN que codifican las cadenas liviana y pesada de dicho anticuerpo se aíslan por medio de técnicas convencionales de biología molecular, por ejemplo, mediante la amplificación por PCR de ADN del conjunto de presentación de fagos (por ejemplo, el fago) que fue aislado durante el análisis de la biblioteca. Las secuencias de nucleótidos de los genes de las cadenas liviana y pesada del anticuerpo que pueden usarse para preparar cebadores de ARN son bien conocidas por aquellos entrenados en la técnica. Se describen varias de estas secuencias, por ejemplo, en Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of*

*Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242, y en la base de datos de la línea germinal humana VBASE.

Un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención puede producirse expresando de forma recombinante los genes de las cadenas liviana y pesada de la inmunoglobulina en una célula hospedera. Con el fin de expresar de forma recombinante un anticuerpo, una célula hospedera se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que contienen fragmentos de ADN que codifican las cadenas liviana y pesada de la inmunoglobulina de dicho anticuerpo, con lo que se expresan las cadenas liviana y pesada en la célula hospedera, y preferiblemente se las secreta en el medio donde se cultivan dichas células huésped. Los anticuerpos pueden aislarse a partir de este medio. Se usan métodos de ADN recombinante convencionales para obtener genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, para insertar dichos genes en vectores de expresión recombinantes, y para introducir dichos vectores en células huésped. Los métodos de este tipo se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis (editores), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (editore) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989), y en US 4816397, por Boss et al.

Una vez que se han obtenido fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL del anticuerpo de interés, dichos fragmentos de ADN pueden someterse a manipulaciones adicionales usando técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de

regiones variables en genes de cadenas de anticuerpos completas, en genes de fragmentos Fab o en genes scFv. Estas manipulaciones comprenden unir operativamente un fragmento de ADN que codifica VL o VH con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, por ejemplo, la región constante de un anticuerpo o un conector flexible. Ha de interpretarse que el término "unidos operativamente" denota que los dos fragmentos de ADN están unidos de modo tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por dichos dos fragmentos de ADN permanecen en el mismo marco.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de una cadena pesada completa uniendo operativamente el ADN que codifica la región VH con otra molécula de ADN que codifica una región constante de una cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son bien conocidas (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242), y los fragmentos de ADN que incluyen dichas regiones pueden obtenerse por medio de una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE o IgD, y preferiblemente es una región constante de IgG, en particular, IgG1 o IgG4. Para obtener un gen de un fragmento Fab de una cadena pesada, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica meramente la región constante de la cadena pesada CH1.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de una cadena liviana completa (y un gen de una cadena liviana Fab) uniendo

operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena liviana CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena liviana humana son bien conocidas (véase Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Publicación del NIH N° 91-3242), y los fragmentos de ADN que incluyen dichas regiones pueden obtenerse por medio de una amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda, de las cuales se prefiere una región constante kappa.

Con el objeto de generar un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL pueden unirse operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias VH y VL se expresen como una proteína de una cadena sencilla continua, donde las regiones VL y VH estarán unidas entre sí a través de dicho conector flexible (véanse Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554).

Es posible aislar dominios VH y VL individuales con afinidades de unión como se describió con anterioridad a partir de bibliotecas de dominios individuales, de acuerdo con los métodos descritos con anterioridad. Dos cadenas de dominios VH individuales (con o sin CH1), dos cadenas VL, o un par de una cadena VH y una cadena VL con la afinidad de unión deseada, pueden ser útiles como se describe en la presente documentación para los anticuerpos de la invención.

Con el fin de expresar los anticuerpos recombinantes o las porciones de anticuerpos de la invención, los ADN que codifican cadenas livianas y pesadas parciales o completas pueden insertarse en vectores de expresión, de modo de unir operativamente los genes a secuencias de control de la transcripción y la traducción apropiadas. En este contexto, el término "unido operativamente" denota que un gen de un anticuerpo está unido en un vector, de modo que las secuencia de control de la transcripción y la traducción en el vector cumplen la función que se pretende de ellas, que consiste en regular la transcripción y la traducción del gen de dicho anticuerpo.

En la práctica, el vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula hospedera usada para la expresión. El gen para la cadena liviana del anticuerpo y el gen para la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión, donde este último es el caso más común. Los genes de los anticuerpos se insertan en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (por ejemplo, uniendo sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o uniendo extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). El vector de expresión ya puede contener secuencias de regiones constantes de anticuerpos antes de insertar las secuencias de las cadenas liviana y pesada. Por ejemplo, un abordaje consiste en convertir las secuencias VH y VL en genes de anticuerpos completos insertándolas en vectores de expresión que ya contienen las regiones constantes de las cadenas pesada y liviana, respectivamente, con lo que se une operativamente el segmento VH con el o los segmentos CH en el vector, y

también se une operativamente el segmento VL con el segmento CL en el vector.

Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de la célula hospedera. El gen de dicha cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector, con lo que se une el péptido señal en el mismo marco con el extremo N del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína distinta de inmunoglobulina). Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión de la invención pueden tener secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedera.

El término "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos para controlar la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Las secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Aquél entrenado en la técnica ha de apreciar que el diseño del vector de expresión que incluye las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedera a transformar, la fuerza deseada para la expresión de la proteína, etcétera. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que resultan en una expresión fuerte y constitutiva de las proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales

como el promotor/potenciador del CMV), el virus de simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador del SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP)) y poliomias. Para hallar una descripción más detallada de los elementos reguladores virales y sus secuencias, véanse, por ejemplo, US 5168062, de Stinski, US 4510245, de Bell *et al.*, y US 4968615, de Schaffner *et al.*

Aparte de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden tener secuencias adicionales, tales como las que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. Los genes marcadores de selección facilitan la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 4399216, 4634665 y 5179017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, es común que el gen marcador de selección le confiera resistencia a drogas citotóxicas, tales como G418, higromicina o metotrexato, a la célula hospedera en la que se ha insertado el vector. Los genes marcadores de selección incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped *dhfr*<sup>-</sup> con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Para expresar las cadenas liviana y pesada, el o los vectores de expresión que codifican dichas cadenas pesada y liviana se transfectan en una célula hospedera por medio de técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" comprenden una multiplicidad de técnicas de uso común para introducir ADN exógeno en una célula hospedera procariota o



eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y semejantes. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariotas o eucariotas, es preferible expresar los anticuerpos en células eucariotas, y en particular, en células huésped de mamíferos, ya que la probabilidad de que se ensamble y se secrete un anticuerpo plegado correctamente y con actividad inmunológica es mayor en dichas células eucariotas, y en particular en células de mamíferos, que en las células eucariotas. Se ha informado que la expresión de genes de anticuerpos en procariotas no es efectiva para producir rendimientos elevados de anticuerpos activos (Boss, M.A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamíferos preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo las células CHO dhfr<sup>-</sup> descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, que se usan en combinación con un marcador de selección DHFR, como se describe, por ejemplo, en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen los vectores de expresión recombinantes que contienen genes que codifican el anticuerpo en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped hasta que el anticuerpo se expresa en dichas células huésped, o preferiblemente, el anticuerpo se secreta en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Después, los anticuerpos pueden aislarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Del mismo modo, es posible usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Por supuesto, en la invención se incluyen variaciones del procedimiento descrito con anterioridad. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedera con ADN que codifica la cadena liviana o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la invención. Si hay una cadena liviana o una cadena pesada que no es necesaria para la unión al antígeno de interés, es necesario eliminar parcial o completamente el ADN que la codifica usando tecnología de ADN recombinante. Del mismo modo, las moléculas expresadas por dichas moléculas de ADN truncadas se incluyen en los anticuerpos de la invención. Además, es posible producir anticuerpos bifuncionales, donde una cadena pesada y una cadena liviana son un anticuerpo de la invención, y la otra cadena pesada y la otra cadena liviana tienen especificidad por un antígeno diferente del antígeno de interés, por medio de la reticulación de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo, de acuerdo con métodos químicos convencionales.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o una porción de unión a antígeno de éste, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del anticuerpo en células CHO dhfr<sup>-</sup> a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo están unidos operativamente en cada caso a elementos reguladores, que consisten en el potenciador de CMV y el promotor AdMLP, con el fin de producir una transcripción fuerte de dichos genes. El vector de

expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que puede usarse para seleccionar las células CHO dhfr<sup>-</sup> transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo. Por ende, la invención se relaciona con un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención, que comprende cultivar una célula hospedera de la invención en un medio de cultivo apropiado hasta que se ha sintetizado un anticuerpo recombinante de la invención. Además, el método puede comprender aislar dicho anticuerpo recombinante de dicho medio de cultivo.

Como alternativa al análisis de las bibliotecas de anticuerpos recombinantes mediante la presentación de fagos, pueden usarse otros métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica en el análisis de bibliotecas de combinación grandes para identificar los anticuerpos de la invención. Básicamente, puede usarse cualquier sistema de expresión en el que se establezca un enlace físico cercano entre un ácido nucleico y el anticuerpo codificado para seleccionar una secuencia de ácido nucleico apropiada, en virtud de las propiedades del anticuerpo que codifica.

En un tipo de sistema de expresión alternativo, la biblioteca de anticuerpos recombinantes se expresa en forma de fusiones de ARN-proteínas, como se describe en WO 98/31700, de Szostak y Roberts, y en Roberts, R.W.

y Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. En este sistema, la traducción in vitro de ARNm sintéticos que contienen puromicina en su extremo 3', un antibiótico aceptor de peptidilo, genera una fusión covalente de un ARNm y el péptido o la proteína codificada por él. Por lo tanto, es posible concentrar un ARNm específico de una mezcla compleja de ARNm (por ejemplo, una biblioteca de combinación) sobre la base de las propiedades del péptido o la proteína codificada (por ejemplo, el anticuerpo o una porción de éste), tales como la unión de dicho anticuerpo o la porción de éste al globulómero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de éstos, y que se obtienen analizando estas bibliotecas, pueden expresarse en forma recombinante de la manera descrita con anterioridad (por ejemplo, en células huésped de mamífero), y además, pueden someterse a otra maduración por afinidad con un análisis en procedimientos adicionales de fusiones de ARNm-péptidos, pueden introducirse mutaciones en las secuencias seleccionadas originalmente, o pueden usarse otros métodos de maduración de anticuerpos recombinantes por afinidad in vitro de la manera descrita con anterioridad.

#### **Combinaciones de abordajes In vivo e in vitro**

Del mismo modo, los anticuerpos de la invención pueden producirse usando una combinación de abordajes in vivo e in vitro, tales como los métodos donde primero se permite que el globulómero A $\beta$ (20-42), o un derivado de éste, actúe con un repertorio de anticuerpos en un animal huésped in vivo, para estimular la producción de anticuerpos que se unen al globulómero A $\beta$ (20-42) o sus derivados, y luego se realiza la selección y/o la maduración del anticuerpo (es decir, la optimización) con la ayuda de una o más técnicas in vitro. De

acuerdo con una realización, un método combinado de este tipo puede comprender primero inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión transgénica de éstos, o un ratón quimérico) con dicho globulómero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste para estimular una respuesta al antígeno en forma de anticuerpos, y luego preparar una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos usando secuencias de inmunoglobulina de linfocitos que han sido estimulados in vivo por la acción de dicho globulómero A $\beta$ (20-42) o su derivado. El primer paso de este procedimiento combinado puede efectuarse de la manera descrita con anterioridad en conexión con los abordajes in vivo, mientras que el segundo paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los abordajes in vitro. Los métodos preferidos para inmunizar animales no humanos, con el análisis subsiguiente de las bibliotecas de presentación en fagos preparadas a partir de dichos linfocitos estimulados, incluyen aquellos descritos por BioSite Inc; véanse, por ejemplo, WO 98/47343, WO 91/17271, US 5427908 y US 5580717.

De acuerdo con otra realización, un método combinado comprende primero inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión de éstos sometida a knockout y/o transgénica, o un ratón quimérico) con dicho globulómero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste para estimular una respuesta al antígeno en forma de anticuerpos a dicho globulómero A $\beta$ (20-42) o su derivado, y seleccionar los linfocitos que producen los anticuerpos que tienen la especificidad deseada analizando los hibridomas (preparados, por ejemplo, a

partir de animales inmunizados). Los genes de los anticuerpos o los anticuerpos con un solo dominio se aíslan a partir de los clones seleccionados (con métodos de clonación convencionales, tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), y se someten a una maduración por afinidad *in vitro* para mejorar las propiedades de unión del anticuerpo seleccionado o los anticuerpos seleccionados. El primer paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los abordajes *in vivo*, mientras que el segundo paso de este procedimiento puede llevarse a cabo de la manera descrita con anterioridad en conexión con los abordajes *in vitro*, en particular, usando métodos de maduración por afinidad *in vitro*, tales como los descritos en WO 97/29131 y WO 00/56772.

En otro método combinado, los anticuerpos recombinantes se generan a partir de linfocitos individuales aislados usando un procedimiento que es conocido por aquellos entrenados en la técnica, tal como el método de selección de linfocitos con anticuerpos (SLAM), que se describe en US 5627052, WO 92/02551 y Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. En este método, primero se inmuniza un animal no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un pollo, un camélido, una oveja o una cabra, o una versión transgénica de éstos, o un ratón quimérico) con dicho globulómero A $\beta$ (20-42) o un derivado de éste para estimular una respuesta al antígeno en forma de anticuerpos a dicho oligómero o derivado, y luego se seleccionan las células individuales que secretan los anticuerpos de interés usando un ensayo hemolítico en placa específico para el antígeno. Con este fin, el globulómero o el derivado de éste, o moléculas de interés

relacionadas desde el punto de vista estructural, puede unirse a eritrocitos de oveja, usando un conector tal como biotina, con lo que se posibilita la identificación de las células individuales que secretan anticuerpos con una especificidad apropiada usando el ensayo hemolítico en placa. Una vez identificadas las células que secretan los anticuerpos de interés, se obtienen ADNc de las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de las células por PCR con transcriptasa inversa, y dichas regiones variables pueden expresarse posteriormente en combinación con regiones constantes de inmunoglobulina apropiadas (por ejemplo, regiones constantes humanas) en células huésped de mamíferos, tales como células COS o CHO. Las células huésped transfectadas con las secuencias de inmunoglobulina amplificadas derivadas de linfocitos seleccionados in vivo pueden someterse posteriormente a otro análisis in vitro y otra selección in vitro, por ejemplo, dispersando las células transfectadas para aislar las células que expresan anticuerpos con la afinidad de unión deseada. Las secuencias de inmunoglobulina amplificadas pueden someterse a manipulaciones adicionales in vitro.

Los anticuerpos que tienen las afinidades requeridas definidas en la presente documentación pueden seleccionarse realizando un análisis de transferencia puntual, esencialmente como se describió con anterioridad. Brevemente, el antígeno se une a una matriz sólida, preferiblemente se transfiere a una matriz de nitrocelulosa, en diluciones en serie. Después, el antígeno inmovilizado se pone en contacto con el anticuerpo de interés, a lo que sigue la detección de este último por medio de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima y una reacción colorimétrica; con concentraciones definidas de anticuerpo y antígeno, donde la cantidad de anticuerpo unido

permite determinar la afinidad. Por consiguiente, la afinidad relativa de dos anticuerpos diferentes por un blanco, o de un anticuerpo por dos blancos diferentes, se define en la presente documentación como la relación de las cantidades respectivas de anticuerpo unido al blanco observadas con las dos combinaciones de anticuerpo-blanco, bajo condiciones de transferencia puntual que son idénticas en el resto de los aspectos.

Los anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ó 3B10 pueden obtenerse de una manera conocida per se.

Del mismo modo que los anticuerpos pueden competir, como se describió con anterioridad, en la presente documentación se dice que distintas estructuras blanco "compiten" por un anticuerpo particular si al menos una de estas estructuras puede reducir específicamente la unión mensurable de la otra, preferiblemente al ofrecer un epítopo superpuesto o idéntico, más preferiblemente un epítopo idéntico.

Las entidades blanco competitivas son útiles para seleccionar anticuerpos en virtud de su afinidad relativa por estas estructuras blanco. Por ende, las afinidades relativas pueden determinarse directamente usando un ensayo competitivo donde se ponen en contacto formas distinguibles de las entidades competitivas, por ejemplo, entidades competitivas con marcas diferentes, con el anticuerpo de interés, y se deduce la afinidad relativa del anticuerpo por cada una de estas entidades a partir de las cantidades relativas de estas entidades que están unidas al anticuerpo.

Este ensayo de competición puede usarse para incrementar directamente el contenido de anticuerpos que poseen una afinidad relativa por



la entidad blanco, mediante la unión de la entidad por la cual se desea una mayor afinidad a una matriz sólida de soporte, a lo que sigue la adición al medio de una cantidad apropiada, preferiblemente un exceso molar, de la entidad competitiva por la cual se desea una menor afinidad. Por lo tanto, los anticuerpos que presenten las afinidades relativas deseadas tenderán a unirse a la matriz con mayor fuerza que los otros, y podrán obtenerse después de eliminar las menos deseables por lavado, por ejemplo, mediante un lavado con concentraciones de sal baja, seguido por la cosecha del anticuerpo unido al desprenderlo de forma reversible de su blanco con concentraciones de sal elevadas. Si se lo desea, pueden llevarse a cabo varios procedimientos de enriquecimiento. En una realización particular de la invención, cuando el genotipo subyacente de un anticuerpo está conectado físicamente a este anticuerpo, por ejemplo, en un conjunto de hibridomas, fagos que presentan antígenos o células de levadura, puede rescatarse el fenotipo correspondiente.

En otra realización de la invención se usa una transferencia puntual modificada, donde el antígeno inmovilizado compite por la unión al anticuerpo con una entidad disuelta, de modo que la afinidad relativa del anticuerpo puede deducirse a partir del porcentaje unido al antígeno inmovilizado.

Es posible producir porciones de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y  $F(ab')_2$ , a partir de anticuerpos completos, usando procedimientos convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina. Además, los anticuerpos, las porciones de los anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

La presente invención también se relaciona con agentes farmacéuticos (composiciones) que comprenden un anticuerpo de la invención, y opcionalmente, un vehículo aceptable para el uso farmacéutico. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad que puede ser aliviada con los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, si el anticuerpo de la invención se une a un globulímero de la invención, la composición farmacéutica puede contener además uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles para el tratamiento de trastornos donde la actividad de dicho globulímero es importante.

Los vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y para demorar la absorción, y semejantes, siempre que sean compatibles con el medio fisiológico. Los vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, y semejantes, y combinaciones de éstos. En muchos casos, es preferible usar agentes isotónicos adicionales, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio. Además, los vehículos aceptables para el uso farmacéutico pueden contener cantidades relativamente pequeñas de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, preservantes o amortiguadores, que incrementan la vida media o la eficacia de los anticuerpos.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser apropiadas para la administración parenteral, por ejemplo. En este caso, los anticuerpos

preferiblemente se preparan como soluciones inyectables con un contenido de anticuerpo de 0,1-250 mg/ml. Las soluciones inyectables pueden prepararse en una forma líquida o liofilizada, donde la forma de dosificación es una cápsula o un recipiente de vidrio, una ampolla o una jeringa rellena. El amortiguador puede contener L-histidina (1-50 mM, preferiblemente 5-10 mM) y puede tener un pH de 5,0-7,0, preferiblemente 6,0. Otros amortiguadores apropiados incluyen, sin limitaciones, amortiguadores de succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Es posible usar cloruro de sodio para ajustar la tonicidad de la solución hasta una concentración de 0-300 mM (preferiblemente 150 mM para una forma de dosificación líquida). También pueden incluirse crioprotectores, por ejemplo, sacarosa (por ejemplo, 0-10%, preferiblemente 0,5-1,0%) para una forma de dosificación liofilizada. Otros crioprotectores apropiados son la trehalosa y la lactosa. También pueden incluirse rellenos, por ejemplo, manitol (por ejemplo, 1-10%, preferiblemente 2-4%) para una forma de dosificación liofilizada. Es posible usar estabilizadores, por ejemplo L-metionina (por ejemplo, 5-50 mM, preferiblemente 5-10 mM) en las formas de dosificación líquidas y liofilizadas. Otros rellenos apropiados son la glicina y la arginina. También pueden usarse agentes tensioactivos, por ejemplo, polisorbato 80 (por ejemplo, 0-0,05%, preferiblemente 0,005-0,01%). Otros agentes tensioactivos son el polisorbato 20 y los agentes tensioactivos BRIJ.

Las composiciones de la invención pueden tomar una multiplicidad de formas. Éstas incluyen formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y para infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y

supositorios. La forma preferida depende del tipo de administración y la aplicación terapéutica deseada. Típicamente, es preferible administrar las composiciones en forma de soluciones inyectables o para infusión, por ejemplo, composiciones que son similares a otros anticuerpos para la inmunización pasiva de seres humanos. La ruta de administración preferida es la parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de preparación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como soluciones, microemulsiones, dispersiones, liposomas u otras estructuras ordenadas, apropiadas para contener concentraciones elevadas de la sustancia activa. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse introduciendo el compuesto activo (es decir, el anticuerpo) en la cantidad requerida en un solvente apropiado, según sea apropiado, con uno o una combinación de los ingredientes mencionados con anterioridad, de ser necesarios, y luego realizando una filtración estéril de dicha solución. Las dispersiones comúnmente se preparan introduciendo el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico, y según sea apropiado, otros ingredientes necesarios. En el caso de un polvo liofilizado estéril para preparar soluciones inyectables estériles, el secado al vacío y el secado a chorro son métodos de preparación preferidos, que resultan en un polvo del ingrediente activo, y cuando sea apropiado, de otros ingredientes deseados provenientes de una solución previamente sometida a

una filtración estéril. La viscosidad correcta de una solución puede mantenerse usando, por ejemplo, un recubrimiento, tal como lecitina, o en el caso de las dispersiones, manteniendo el tamaño de partícula necesario, o usando agentes tensioactivos. Es posible obtener la absorción prolongada de las composiciones inyectables introduciendo adicionalmente en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse a través de una multiplicidad de métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, aunque el tipo preferido de administración para muchas aplicaciones terapéuticas es la inyección subcutánea, la inyección intravenosa o la infusión. Aquellos entrenados en la técnica han de apreciar que la ruta y/o el tipo de administración dependen del resultado deseado. De acuerdo con realizaciones particulares, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que protege el compuesto contra la liberación rápida, tal como por ejemplo, una formulación de liberación sostenida o controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles degradables en un medio biológico, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar estas formulaciones son bien conocido por aquellos entrenados en la técnica; véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

De acuerdo con realizaciones particulares, un anticuerpo de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, en un diluyente inerte o un vehículo metabolizable comestible. El anticuerpo (y otros ingredientes, de ser

necesarios) también puede colocarse en cápsulas de gelatina duras o blandas, puede comprimirse en tabletas o agregarse directamente en el alimento. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos pueden mezclarse con excipientes y usarse en forma de tabletas orales, tabletas bucales, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y semejantes. Si se desea administrar un anticuerpo de la invención a través de una ruta distinta de la parenteral, puede ser necesario elegir un recubrimiento de un material que evite su inactivación.

La presente invención también se relaciona con un método para inhibir la actividad de los globulómeros de la invención en un individuo que sufre un trastorno donde participa la proteína  $\beta$  amiloide, y donde, en particular, la actividad de dichos globulómeros de la invención es importante. Dicho método comprende la administración de al menos un anticuerpo de la invención al individuo, con el objeto de inhibir la actividad del globulómero al cual se une el anticuerpo. Dicho individuo preferiblemente es un ser humano. Un anticuerpo de la invención puede administrársele a un individuo humano con propósitos terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrársele a un mamífero no humano para propósitos veterinarios, o dentro del marco de un modelo animal de un trastorno particular. Estos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, para evaluar las dosificaciones y los cronogramas de administración).

Los trastornos donde participan los globulómeros de la invención incluyen en particular trastornos en cuyo desarrollo y/o progresión participa un globulómero de la invención. Estos son en particular aquellos trastornos donde los globulómeros de la invención son evidente o presumiblemente

responsables de la patofisiología de dicho trastorno, o son un factor que contribuye al desarrollo y/o la progresión de dicho trastorno. Por ende, en la presente documentación se incluyen aquellos trastornos donde la inhibición de la actividad de los globulómeros de la invención puede aliviar los síntomas y/o la progresión del trastorno. Estos trastornos pueden verificarse, por ejemplo, a partir de una concentración incrementada de los globulómeros de la invención en un fluido biológico de un individuo que sufre un trastorno particular (por ejemplo, una concentración incrementada en suero, plasma, CSF, orina, etcétera). Esto puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo de la invención. Los globulómeros de la invención tienen una participación importante en la patología asociada con una multiplicidad de trastornos donde hay elementos neurodegenerativos, deficiencias cognitivas, elementos neurotóxicos y elementos inflamatorios.

En otro aspecto de la invención, los trastornos que pueden tratarse o prevenirse incluyen aquellos asociados con la amiloidosis. En la presente documentación, el término "amiloidosis" hace referencia a una cantidad de trastornos caracterizados por el plegamiento, la agrupación, la agregación y/o la acumulación anormal de proteínas particulares (amiloides, proteínas fibrosas y sus precursores) en diversos tejidos del cuerpo. En la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down se ve afectado el tejido nervioso, y en la angiopatía amiloide cerebral (CAA) se ven afectados los vasos sanguíneos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad eficaz para el uso profiláctico" de un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención. En la presente documentación, una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace

referencia a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico deseado. Aquellos entrenados en la técnica pueden determinar qué constituye una cantidad eficaz para el uso terapéutico del anticuerpo o la porción de anticuerpo, donde dicha cantidad puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo de provocar la respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz para el uso terapéutico también es una donde los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o la porción de anticuerpo son sobrepasados por los efectos beneficiosos para la terapia. Una "cantidad eficaz para el uso terapéutico" hace referencia a una cantidad efectiva, en dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad eficaz para el uso terapéutico será menor que cantidad eficaz para el uso terapéutico.

Más aún, en la presente invención se incluye otro método para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer en un paciente que necesita dicha prevención o tratamiento. Este método comprende el paso de administrarle la vacuna indicada con anterioridad al paciente, en una cantidad suficiente para efectuar la prevención o el tratamiento.

Además, en la presente invención se incluye un método para identificar compuestos apropiados para la inmunización activa de un paciente del que se predice que desarrollará una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Este método comprende 1) exponer uno o más compuestos de interés a uno o más de los anticuerpos descritos con anterioridad, por un



periodo de tiempo y bajo condiciones suficientes para que uno o más compuestos se unan a uno o más anticuerpos; 2) identificar aquellos compuestos que se unieron a uno o más anticuerpos, donde los compuestos identificados pueden usarse en la inmunización activa en un paciente del que se predice que desarrollará una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Dentro del marco del uso de los anticuerpos para diagnóstico, la determinación cualitativa o cuantitativa específica del globulímero sirve en particular para diagnosticar formas del péptido amiloide  $\beta$  relevantes para enfermedades. En este contexto, la especificidad hace referencia a la posibilidad de detectar un globulímero particular, un derivado de éste o una mezcla de éste con una sensibilidad suficiente. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención tienen concentraciones umbrales de detección menores que 10 ng/ml de muestra, preferiblemente menores que 1 ng/ml de muestra, y en particular preferiblemente menores que 100 pg/ml de muestra, lo que significa que con los anticuerpos de la invención puede detectarse al menos la concentración de globulímero por ml de muestra indicada en cada caso, y ventajosamente también pueden detectarse concentraciones más bajas.

La detección se realiza por medios inmunológicos. En principio, esto puede realizarse usando cualquier método de ensayo de análisis o diagnóstico en el que se usen anticuerpos, incluyendo aglutinación y precipitación, inmunoensayos, métodos inmunohistoquímicos y técnicas de inmunotransferencia, por ejemplo, Western blot, o preferiblemente, métodos de

transferencia puntual. En la presente documentación también se incluyen los métodos in vivo, por ejemplo, métodos de diagnóstico por imágenes.

El uso en inmunoensayos es ventajoso. Son apropiados los inmunoensayos competitivos, es decir, los ensayos donde el antígeno y el antígeno marcado (marcador) compiten por la unión al anticuerpo, y los inmunoensayos en sándwich, es decir, los ensayos donde la unión de anticuerpos específicos con el antígeno se detecta con un segundo anticuerpo, comúnmente marcado. Estos ensayos pueden ser homogéneos, es decir, sin la separación en fases sólidas y líquidas, o heterogéneos, es decir, las marcas unidas se separan de las no unidas, por ejemplo, con anticuerpos unidos a una fase sólida. Dependiendo de la marca y el método de medición, los diversos formatos heterogéneos y homogéneos de los inmunoensayos pueden separarse en clases particulares, por ejemplo RIA (radioinmunoensayos), ELISA (ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas), FIA (inmunoensayos de fluorescencia), LIA (inmunoensayos de luminiscencia), TRFIA (FIA con resolución temporal), IMAC (inmunoactivación), EMIT (prueba inmune multiplicada con enzimas), TIA (inmunoensayo turbidométrico), I-PCR (inmuno-PCR).

Para cuantificar el globulímero de la invención, se prefieren los inmunoensayos competitivos donde una cantidad definida de un derivado de globulímero marcado, que sirve como marcador, compite con el globulímero de la muestra (que contiene una cantidad desconocida de globulímeros no marcados) en la que se desea cuantificar la unión al anticuerpo usado. La cantidad de antígeno, es decir, la cantidad de globulímero, en la muestra

puede determinarse a partir de la cantidad de marcador desplazado con la ayuda de una curva de referencia.

De las marcas disponibles para estos propósitos, las enzimas han probado ser ventajosas. Pueden usarse sistemas basados en peroxidasas, en particular, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -D-galactosidasa, por ejemplo. Para estas enzimas hay disponibles sustratos específicos cuya conversión puede monitorearse por medios fotométricos, por ejemplo. Los sistemas de sustratos apropiados están basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/tetrazolio de nitroazul (BCIP/NPT), rojo Fast/fosfato de naftol-AS-TS para la fosfatasa alcalina; ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinehidrazona (MBTH) para las peroxidasas; o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido y 4-metilumbellifenil- $\beta$ -D-galactósido (MUG) para la  $\beta$ -D-galactosidasa. En muchos casos, estos sistemas de sustratos están disponibles comercialmente en una forma lista para usar, por ejemplo, en forma de tabletas que también pueden contener reactivos adicionales, tales como amortiguadores apropiados, y semejantes.

Las marcas usadas pueden ser globulómeros marcados. En este sentido, un globulómero particular puede determinarse marcando el globulómero a determinar y usándolo como marcador.

La unión de las marcas a los globulómeros para preparar marcadores puede efectuarse de una manera conocida per se. Pueden realizarse comentarios análogos a los anteriores sobre la derivatización de los

globulómeros de la invención. Además, hay una cantidad de marcas disponibles que están modificadas apropiadamente para la conjugación con proteínas, por ejemplo, enzimas conjugadas con biotina, avidina, extravidina o estreptavidina, enzimas activadas con maleimida, y semejantes. Estas marcas pueden hacerse reaccionar con el oligómero, o de ser necesario, con el globulómero derivatizado apropiadamente, para obtener el marcado. Si, por ejemplo, se usa un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, primero es necesario biotinilar el globulómero. Del mismo modo, esto puede aplicarse en el orden inverso. Los métodos apropiados con este propósito también son conocidos por aquellos entrenados en la técnica.

Si se selecciona un formato de inmunoensayo heterogéneo, el complejo de antígeno-anticuerpo puede separarse uniéndolo al soporte, por ejemplo, con un anticuerpo anti-idiotípico unido a dicho soporte, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo. Los soportes apropiados, en particular, las placas de microtitulación recubiertas con anticuerpos apropiados, son conocidos, y algunos se hallan disponibles comercialmente.

Además, la presente invención se relaciona con conjuntos de inmunoensayo que tienen al menos un anticuerpo como se describió con anterioridad, y otros componentes. Dichos conjuntos comúnmente toman la forma de una unidad envasada, una combinación de medios para poner en práctica la determinación del globulómero de la invención. Con el objeto de facilitar la manipulación en la mayor medida posible, dichos medios preferiblemente se proporcionan en una forma esencialmente lista para usar. En una disposición ventajosa, se ofrece el inmunoensayo en forma de conjunto de elementos. Un conjunto de elementos comúnmente comprende varios

recipientes para colocar los distintos componentes separados. Todos los componentes pueden proporcionarse en una dilución lista para usar, como un concentrado para diluir o como una sustancia seca o un liofilizado para disolver o suspender; los componentes individuales o combinados pueden congelarse o almacenarse a temperatura ambiente hasta usarlos. Los sueros preferiblemente se congelan de forma instantánea, por ejemplo, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , de modo que, en estos casos, es necesario mantener el inmunoensayo preferiblemente a temperaturas inferiores al punto de congelamiento hasta usarlos.

Otros componentes incluidos en el inmunoensayo dependen del tipo de dicho inmunoensayo. Comúnmente se proporcionan proteínas de referencia, pueden necesitarse o no marcadores, y puede haber un suero control junto con el antisuero. Además, pueden incluirse placas de microtitulación, preferiblemente placas recubiertas con anticuerpos, amortiguadores, por ejemplo, para la evaluación, el lavado o la conversión del sustrato, y el sustrato para la enzima.

Los principios generales de los inmunoensayos y la generación y el uso de los anticuerpos como auxiliares en laboratorios y hospitales pueden hallarse, por ejemplo, en *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow, E., y Lane, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

Por lo tanto, en la presente invención también se incluye un método para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechado de padecer esta enfermedad. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica del paciente; 2) poner en contacto la muestra biológica con al menos uno de los anticuerpos descriptos

con anterioridad, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo; y 3) detectar la presencia de los complejos de antígeno/anticuerpo en dicha muestra, donde la presencia de los complejos indica el diagnóstico de una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en el paciente. El antígeno puede ser, por ejemplo, un globulómero o una porción o un fragmento de éste que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulómero completo (por ejemplo, actividad de unión).

Adicionalmente, en la presente invención se incluye otro método para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechado de padecer esta enfermedad. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica del paciente; 2) poner en contacto la muestra biológica con un antígeno, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno/anticuerpo; 3) agregar un conjugado a los complejos de antígeno/anticuerpo resultantes, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la unión del conjugado al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable; y 4) detectar la presencia de un anticuerpo que puede estar presente en la muestra biológica mediante la detección de una señal generada por el compuesto generador de señal, donde la señal indica el diagnóstico de una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en el paciente. El antígeno puede ser un globulómero o una porción o un fragmento de éste que tiene las mismas propiedades funcionales que el globulómero completo (por ejemplo, actividad de unión).

En la presente invención se incluye un método adicional para diagnosticar una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, en un paciente sospechado de padecer una amiloidosis, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Este método comprende los siguientes pasos: 1) aislar una muestra biológica de dicho paciente; 2) poner en contacto la muestra con un anti-anticuerpo, donde el anti-anticuerpo es específico para uno de los anticuerpos descritos con anterioridad, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir la formación de complejos anti-anticuerpo/anticuerpo, donde los complejos que contienen el anticuerpo están presentes en la muestra biológica; 2) agregar un conjugado para obtener complejos anti-anticuerpo/anticuerpo, por un período de tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, donde el conjugado comprende un antígeno que se une a un compuesto generador de señal que es capaz de generar una señal detectable; y 3) detectar la señal generada por el compuesto generador de señal, donde la señal indica un diagnóstico de amiloidosis, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, en el paciente.

También, en la presente invención se incluye un conjunto de elementos que comprende: a) al menos uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y b) a un conjugado que comprende un anticuerpo unido a un compuesto generador de señal, donde el anticuerpo del conjugado es diferente del anticuerpo aislado.

En la presente invención también se incluye un conjunto de elementos que comprende: a) un anti-anticuerpo contra uno de los anticuerpos descritos con anterioridad y b) un conjugado que comprende un antígeno unido a un

compuesto generador de señal. Donde el antígeno puede ser un globulímero o un fragmento o una porción de éste que tiene las mismas características funcionales que el globulímero (por ejemplo, actividad de unión).

En una realización de diagnóstico de la presente invención, un anticuerpo de la presente invención, o una porción de éste, se aplica sobre una fase sólida (o está presente en una fase líquida). La prueba o la muestra biológica (por ejemplo, sangre completa, fluido cerebroespinal, suero, etcétera) se pone en contacto posteriormente con la fase sólida. Si el antígeno (por ejemplo, el globulímero) está presente en la muestra, dicho antígeno se une a los anticuerpos en la fase sólida, y luego es detectado con un método directo o indirecto. El método directo comprende simplemente detectar la presencia del complejo mismo, y por lo tanto, la presencia de antígenos. En el método indirecto, se agrega un conjugado al antígeno unido. El conjugado comprende un segundo anticuerpo que se une al antígeno unido, unido a un compuesto generador de señal o una marca. Si el segundo anticuerpo se une al antígeno unido, el compuesto generador de señal genera una señal mensurable. Después, esta señal indica la presencia del antígeno en la muestra de prueba.

Los ejemplos de fases sólidas usadas en los inmunoensayos de diagnóstico son los materiales porosos y no porosos, las partículas de látex, las partículas magnéticas, las micropartículas (véase la Patente de los EEUU N° 5705330), las esferas, las membranas, las placas de microtitulación y los tubos plásticos. La elección del material de la fase sólida y el método para marcar el antígeno o el anticuerpo presente en el conjugado, si se lo desea, se determina sobre la base de las características de desempeño deseadas para el formato de ensayo.



Como se indicó con anterioridad, el conjugado (o el reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o tal vez, el anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo) unido a un compuesto generador de señal o una marca. Este compuesto generador de señal o "marca" es detectable o puede hacerse reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Los ejemplos de compuestos generadores de señales incluyen cromógenos, radioisótopos (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{14}\text{C}$ ), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes formadores de complejos, o catalizadores, tales como enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromo, fluoro o lumogénico resulta en la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección, tales como la fluorescencia con resolución temporal, la fluorescencia de reflexión interna, la amplificación (por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa) y la espectroscopía de Raman.

Los ejemplos de fluidos biológicos que pueden evaluarse en los inmunoensayos anteriores incluyen plasma, sangre completa, sangre completa deshidratada, suero, fluido cerebroespinal o extractos acuosos o no acuosos de tejidos y células.

La presente invención también abarca un método para detectar la presencia de anticuerpos en una muestra de prueba. Este método comprende los siguientes pasos: (a) poner en contacto la muestra sospechada de contener los anticuerpos con un anti-anticuerpo específico para los anticuerpos en la

muestra del paciente, por un período de tiempo y bajo condiciones suficiente para permitir la formación de complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo, donde el anti-anticuerpo es un anticuerpo de la presente invención que se une a un anticuerpo en la muestra del paciente; (b) agregar un conjugado a los complejos de anti-anticuerpo/anticuerpo resultantes, donde el conjugado comprende un antígeno (que se une al anti-anticuerpo) unido a un compuesto generador de señal con el que puede detectarse una señal detectable; y (d) detectar la presencia de los anticuerpos que pueden estar presentes en la muestra de prueba por medio de la detección de la señal generada por el compuesto generador de señal. Puede usarse un control o calibrador que comprende un anticuerpo contra el anti-anticuerpo.

Dentro del alcance de la invención también se incluyen conjuntos de elementos. Más específicamente, en la presente invención se incluyen conjuntos de elementos para determinar la presencia de antígenos (por ejemplo, globulómeros) en un paciente sospechado de padecer la enfermedad de Alzheimer u otra condición caracterizada por una alteración cognitiva. En particular, un conjunto de elementos para determinar la presencia de antígenos en una muestra de prueba comprende a) un anticuerpo como se define en la presente documentación, o una porción de éste; y b) un conjugado que comprende un segundo anticuerpo (que presenta especificidad por el antígeno) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. El conjunto de elementos también puede contener un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno.

En la presente invención también se incluye un conjunto de elementos para detectar anticuerpos en una muestra de prueba. El conjunto de elementos

puede comprender a) un anti-anticuerpo específico (por ejemplo, uno del sujeto invención) para el anticuerpo de interés y b) un antígeno o una porción de éste, como se definió con anterioridad. También puede incluirse un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno. Más específicamente, el conjunto de elementos puede comprender a) un anti-anticuerpo (tal como uno de la presente invención) específico para el anticuerpo y b) un conjugado que comprende un antígeno (por ejemplo, un globulímero) unido a un compuesto generador de señal capaz de generar una señal detectable. Nuevamente, el conjunto de elementos también puede comprender un control o calibrador que comprende un reactivo que se une al antígeno.

El conjunto de elementos también puede comprender un recipiente, tal como un tubo, una botella o una cinta, donde cada uno de estos recipientes contiene una fase sólida preparada, y otros recipientes que contienen los conjugados respectivos. Estos conjuntos de elementos también pueden contener recipientes o envases para los otros reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo, tales como reactivos de lavado, procesamiento e indicadores.

También vale destacar que en la presente invención no solamente se incluyen los anticuerpos completos descritos con anterioridad, sino también porciones o fragmentos de éstos, por ejemplo, su porción Fab. Adicionalmente, la presente invención abarca cualquier anticuerpo que tiene las mismas propiedades de los presentes anticuerpos en términos, por ejemplo, de especificidad de unión, estructura, etcétera.

**Ventajas de la invención:**

Al realizar la inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42), pueden obtenerse distintos anticuerpos monoclonales que difieren en su tolerancia o su capacidad de reconocimiento de distintos oligómeros A $\beta$ (1-42) y oligómeros A $\beta$ (X-42), lo que se determina por transferencia puntual comparativa, como se describió con anterioridad. Esto permite desarrollar un anticuerpo dirigido a oligómeros A $\beta$  con cortes N-terminales que poseen una relación óptima entre el efecto potenciador de la cognición, la especificidad deseada sobre otras formas de A $\beta$  y el bajo perfil de efectos colaterales. Sorprendente, los globulómeros A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (12-42), a pesar de contener el elemento estructural, solamente son reconocidos parcialmente por los anticuerpos obtenidos cuando se usa el globulómero A $\beta$ (20-42) cortado como antígeno.

Al restringir la forma oligomérica específica de A $\beta$  al principio estructural básico (es decir, el uso de globulómeros A $\beta$  con cortes N-terminales), se genera un perfil de anticuerpos en la inmunización activa que es muy específico para las formas oligoméricas de A $\beta$ . Lo mismo es válido para los anticuerpos monoclonales que han de usarse en la inmunización pasiva. La ventaja de esta estrategia específica para la inmunización (activa y pasiva) es que no inducirá una respuesta inmune contra los monómeros A $\beta$ , los péptidos A $\beta$  en estados de agregación fibrilar o sAPP $\alpha$ . Esto es ventajoso en diversos aspectos:

- 1) En forma de placas A $\beta$  insolubles, los péptidos A $\beta$  en estados de agregación fibrilar dan cuenta de la mayor parte del conjunto completo de péptidos A $\beta$  en los cerebros con AD. Una liberación masiva de A $\beta$  debida a la disolución de las placas A $\beta$ , inducida por la reacción de anticuerpos anti-A $\beta$  anticuerpos estas placas, puede considerarse

perjudicial. Esta liberación masiva de A $\beta$  cruzaría posteriormente la barrera hematoencefálica, ingresaría en el torrente sanguíneo e incrementaría potencialmente el riesgo de microhemorragias. Además, en la prueba ELAN, esta misma estrategia de inmunización con formas fibrilares del péptido A $\beta$  motivó la cancelación de la prueba, debido a que 6% de los casos presentaron un inicio temprano de meningoencefalitis.

- 2) Las respuestas inmunes dirigidas a las formas monoméricas del péptido A $\beta$  son indeseables, ya que fue posible demostrar que estas últimas pueden ejercer efectos que potencian la cognición.
- 3) Del mismo modo, las respuestas inmunes dirigidas a sAPP $\alpha$  también son indeseables, ya que esto puede resultar en una reacción con la proteína precursora de ocurrencia fisiológica APP, y por lo tanto, en una reacción autoinmune. Más aún, también se demostró que sAPP $\alpha$  ejerce efectos que potencian la cognición.
- 4) Es necesario evitar una respuesta dirigida a péptido A $\beta$  vascular en forma de CAA, con el fin de evitar efectos colaterales indeseables en forma de microhemorragias (anticuerpos contra la porción central de A $\beta$ , y que además no se unen a los péptidos A $\beta$  agregados en forma de CAA, inducen menos microhemorragias en comparación con aquellos contra el extremo N, véase la descripción anterior).
- 5) Los anticuerpos que reaccionen específicamente con los oligómeros A $\beta$  tendrán una mayor biodisponibilidad con relación a las especies de A $\beta$  relevantes desde el punto de vista patofisiológico, ya que no se unirán,

por ejemplo, al A $\beta$  fibrilar, por lo que no estarán disponibles para el efecto terapéutico.

Información de depósito: El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 5F7 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, el 1º de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7241. Además, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 10F11 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1º de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7239. Adicionalmente, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 4B7 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1º de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7242, y el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 7C6 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1º de Diciembre de 2005, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7240. Adicionalmente, el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 6A2 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7409, y el hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 2F2 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la

designación PTA-7408. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 4D10 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 28 de Febrero de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7405. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 7E5 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 16 de Agosto de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7809. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 10C1 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 16 de Agosto de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7810. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 3B10 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801, el 1º de Septiembre de 2006, bajo los términos del Tratado de Budapest, y recibió la designación PTA-7851. Todos los depósitos se realizaron a nombre de Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 (EEUU).

#### Descripción de los dibujos:

En la Figura 1 se ilustran cromatogramas de exclusión por tamaño de  $A\beta(1-42)$  y  $A((1-40))$ . El monómero  $A\beta(1-42)$  fue disuelto en A) 0,1% de  $NH_4OH$ , B) 70% de ácido fórmico, C) 0,1% de  $NaOH$ , y en D),  $A((1-40))$  se disolvió en 0,1% de  $NaOH$ . Después, las muestras se diluyeron 1:10 en  $NaH_2PO_4$  20 mM,  $NaCl$  140 mM, pH 7,4. Después de disolverlas a temperatura ambiente, las muestras se incubaron por 5 minutos (columna izquierda) o 1 hora (columna derecha), y luego se aplicaron a la columna de exclusión de tamaño.

En la Figura 2 se ilustra A) un SDS PAGE de proteínas de referencia (marcadores moleculares proteicos), carril 1); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42); control (carril 2); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37°C, sobrenadante (carril 3); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37°C, precipitado (carril 4); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37°C, sobrenadante (carril 5); preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37°C, precipitado (carril 6); B) los resultados del análisis cuantitativo de mAb unidos a fibrillas A $\beta$ , expresados como porcentaje de anticuerpo total.

La Figura 3 es un diagrama de barras donde se ilustran los resultados de la prueba de reconocimiento de objetos con ratones transgénicos APP/L tras una inmunización activa con monómeros A $\beta$ (1-42) en 0,1% de NH<sub>4</sub>OH, globulómeros A $\beta$ (1-42) y globulómeros A $\beta$ (20-42), en comparación con ratones tipo salvaje (control positivo) y ratones APP/L tratados con PBS (control negativo), donde los círculos indican diferencias significativas respecto de los ratones APP/L tratados con PBS, y los asteriscos indican diferencias altamente significativas con relación al nivel de azar (50%), de acuerdo con pruebas t post-hoc después de P<0,05 en un ANOVA para las diferencias entre los grupos.

En la Figura 4 se ilustran transferencias puntuales de la reactividad de 100 pmol/ $\mu$ l (fila A); 10 pmol/ $\mu$ l (fila B); 1 pmol/ $\mu$ l (fila C); 0,1 pmol/ $\mu$ l (fila D) y 0,01 pmol/ $\mu$ l (fila E) de globulómero A $\beta$ (1-42) (columna 1); monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68 (columna 2); globulómero A $\beta$ (20-42) (columna 3); globulómero A $\beta$ (12-42) (columna 4); monómero A $\beta$ (1-40) pretratado con HFIP en DMSO (columna 5); monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH



(columna 6); una preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42) (columna 7); y sAPP $\alpha$  de Sigma (columna 8), con diversos antisueros obtenidos después de una inmunización activa de ratones transgénicos APP/L con globulómero A $\beta$ (20-42).

La Figura 5 es un diagrama de barras donde se ilustran las concentraciones de péptidos A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40) solubles e insolubles en extractos del cerebro de ratones transgénicos APP/PS1 sometidos a inmunización activa, ya sea con monómero A $\beta$ (1-42) (0,1% de NH<sub>4</sub>OH), globulómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (20-42) o un vehículo como control.

La Figura 6 es un diagrama de barras donde se ilustran los resultados de la prueba de reconocimiento de objetos con ratones transgénicos APP/L, después de una inmunización pasiva con los anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ (20-42) 5F7, 10F11 y 7C6, en comparación con los ratones control para A) cada anticuerpo por separado y B) todos los anticuerpos juntos.

En la Figura 7 se ilustra A) un análisis de transferencia puntual de la especificidad de distintos anticuerpos anti-A $\beta$  (-6E10, -5F7, -4B7, -10F11, -6A2, -4D10, -3B10, -2F2, -7C6, -7E5, -10C1). Los anticuerpos monoclonales evaluados en este caso se obtuvieron por medio de la inmunización activa de ratones con globulómero A $\beta$ (20-42), a lo que siguió la selección de células de hibridomas (con la excepción de 6E10, Signet N° 9320, disponible comercialmente). Las formas individuales de A $\beta$  fueron aplicadas en diluciones en serie e incubadas con los anticuerpos monoclonales respectivos para la reacción inmune:

1. monómero A $\beta$ (1-42), 0,1% de NH<sub>4</sub>OH

2. monómero A $\beta$ (1-40), 0,1% de NH<sub>4</sub>OH
3. monómero A $\beta$ (1-42), 0,1% de NaOH
4. monómero A $\beta$ (1-40), 0,1% de NaOH
5. globulómero A $\beta$ (1-42)
6. globulómero A $\beta$ (12-42)
7. globulómero A $\beta$ (20-42)
8. preparación de fibrillas A $\beta$ (1-42)
9. sAPP $\alpha$  (Sigma) (primer punto: 1 pmol)

B) La evaluación cuantitativa fue realizada utilizando un análisis densitométrico de la intensidad. Para cada forma A $\beta$ , se evaluó únicamente el punto correspondiente a la concentración de antígeno más baja, siempre que tuviera una densidad relativa mayor a 20% de la densidad relativa del último punto de globulómero A $\beta$ (20-42) (umbral). Este valor umbral se determinó para cada transferencia puntual de manera independiente. El valor indica la relación entre el reconocimiento de globulómero A $\beta$ (20-42) y la forma A $\beta$  respectiva para el anticuerpo dado.

En la Figura 8 se ilustra la unión de los anticuerpos en distintas concentraciones, con secciones transversales de las neocortezas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (AD), o ratones transgénicos APP viejos:

A) La verificación mediante la coloración con rojo Congo de depósitos amiloides como placas en tejido cerebral y como angioplastias amiloides cerebrales (CAA), en vasos del cerebro de ratones transgénicos APP de la línea Tg2576 y en un paciente con AD (RZ55).

B) La coloración fuerte de depósitos parenquimáticos de A $\beta$  (placas amiloides) en un paciente con AD (RZ16) ocurre solamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente (columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0,7  $\mu$ g/ml;

C) La coloración fuerte de los depósitos parenquimáticos de A $\beta$  (placas amiloides) en ratones Tg2576 de 19 meses de edad ocurre únicamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente (columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0.7  $\mu$ g/ml;

D)-G) Cuantificación del análisis de la coloración de la placa A $\beta$  en las imágenes histológicas usando análisis de imágenes. Los valores de densidad óptica (0% = sin coloración) fueron calculados a partir de la escala de valores de escala de grises en placas, a los que se les sustrajeron los valores de escala de grises del tejido de fondo: D) coloración con 0,7  $\mu$ g/ml de anticuerpo en un ratón Tg2576 viejo, E) coloración con 3 concentraciones diferentes de anticuerpos en ratones APP/L, F) coloración con 0,7  $\mu$ g/ml de anticuerpo en un paciente con AD (RZ55), y G) coloración con 3 niveles diferentes de concentraciones de anticuerpos en un paciente con AD (RZ16). Las diferencias de coloración entre los anticuerpos 6E10, disponibles comercialmente (asteriscos), y 4G8 (círculos), y todos los otros anticuerpos (tres asteriscos/círculos:  $p < 0,001$  versus control; prueba t post-hoc de Bonferroni

después de un ANOVA con  $p < 0,001$ ) se sometieron a una evaluación estadística (D, F). En E) y G), todos los anticuerpos, con excepción de 6G1, siempre presentaron una coloración significativamente menor que los anticuerpos 6E10, disponibles comercialmente, y 4G8 ( $p < 0,001$  en una prueba  $t$  post-hoc después de  $p < 0,001$  en el ANOVA).

H) La coloración fuerte de los depósitos vasculares de A $\beta$  (flechas) ocurre únicamente con 6G1 y el anticuerpo 6E10, disponible comercialmente (columna izquierda); mientras que los anticuerpos 5F7, 2F2 y 6A2 (segunda columna), 4D10, 10F11 y 3B10 (tercera columna) y 7C6, 7E5 y 10C1 (columna derecha) no presentan coloración alguna. Todos los anticuerpos fueron utilizados en una concentración de 0,7  $\mu\text{g/ml}$ . Se halló una situación cualitativa similar en el ratón Tg2576 (no indicado aquí);

En la Figura 9 se ilustran las titulaciones del anticuerpo anti-A $\beta$  y del perfil de selectividad de la transferencia puntual en plasma de ratones TG2576, aproximadamente un año después de la inmunización activa. En las pruebas en plasma de ratón Tg2576, aproximadamente un año después de la inmunización con A) globulómero A $\beta$  (20-42), B) globulómero A $\beta$  (12-42), C) monómero A $\beta$  (1-42) y D) vehículo, se evaluaron los anticuerpos anti-A $\beta$  producidos y aún presentes por transferencia puntual.

1. globulómero A $\beta$  (1-42)
2. monómero A $\beta$  (1-42), pretratado con HFIP, en 0,1% de Pluronic F68
3. globulómero A $\beta$  (20-42)
4. globulómero A $\beta$  (12-42)
5. monómero A $\beta$  (1-40), pretratado con HFIP, 5mM en DMSO
6. monómero A $\beta$  (1-42), 0,1% de NH<sub>4</sub>OH

- 7. fibrilla de preparación Aβ (1-42)
- 8. sAPPα (Sigma); (primer punto: 1pmol);

En la Figura 10 se ilustra una tabla donde se resumen los niveles de globulómero Aβ(20-42) en tejido cerebral de seres humanos que sufren la enfermedad de Alzheimer y en un control sin demencia;

En la Figura 11 se ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas variables pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales (mAb) que se indican a continuación (en cada secuencia de aminoácidos se subrayan las regiones de determinación de la complementariedad (CDR)):

| Fig.<br>11 | SEQ<br>Nº | ID | Tipo de<br>secuencia | Cadena                   | mAb   |
|------------|-----------|----|----------------------|--------------------------|-------|
| A1         | 1         |    | nucleótidos          | Variable pesada<br>(VP)  | 5F7   |
| A2         | 2         |    | nucleótidos          | Variable liviana<br>(VL) | 5F7   |
| A1         | 3         |    | aminoácidos          | Variable pesada<br>(VP)  | 5F7   |
| A2         | 4         |    | aminoácidos          | Variable liviana<br>(VL) | 5F7   |
| B1         | 5         |    | nucleótidos          | Variable pesada<br>(VP)  | 10F11 |
| B2         | 6         |    | nucleótidos          | Variable liviana<br>(VL) | 10F11 |

|    |    |             |                  |         |       |
|----|----|-------------|------------------|---------|-------|
| B1 | 7  | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 10F11 |
| B2 | 8  | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 10F11 |
| C1 | 9  | nucleótidos | Variable<br>(VH) | pesada  | 7C6   |
| C2 | 10 | nucleótidos | Variable<br>(VL) | liviana | 7C6   |
| C1 | 11 | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 7C6   |
| C2 | 12 | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 7C6   |
| D1 | 13 | nucleótidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 4B7   |
| D2 | 14 | nucleótidos | Variable<br>(VL) | liviana | 4B7   |
| D1 | 15 | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 4B7   |
| D2 | 16 | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 4B7   |
| E1 | 17 | nucleótidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 2F2   |

|    |    |             |                  |         |      |
|----|----|-------------|------------------|---------|------|
| E2 | 18 | nucleótidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 2F2  |
| E1 | 19 | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 2F2  |
| E2 | 20 | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 2F2  |
| F1 | 21 | nucleótidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 6A2  |
| F2 | 22 | nucleótidos | Variable<br>(VL) | liviana | 6A2  |
| F1 | 23 | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 6A2  |
| F2 | 24 | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 6A2  |
| G1 | 25 | nucleótidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 4D10 |
| G2 | 26 | nucleótidos | Variable<br>(VL) | liviana | 4D10 |
| G1 | 27 | aminoácidos | Variable<br>(VP) | pesada  | 4D10 |
| G2 | 28 | aminoácidos | Variable<br>(VL) | liviana | 4D10 |

|    |    |             |               |         |      |
|----|----|-------------|---------------|---------|------|
| H1 | 29 | nucleótidos | Variable (VP) | pesada  | 7E5  |
| H2 | 30 | nucleótidos | Variable (VL) | liviana | 7E5  |
| H1 | 31 | aminoácidos | Variable (VP) | pesada  | 7E5  |
| H2 | 32 | aminoácidos | Variable (VL) | liviana | 7E5  |
| I1 | 33 | nucleótidos | Variable (VP) | pesada  | 10C1 |
| I2 | 34 | nucleótidos | Variable (VL) | liviana | 10C1 |
| I1 | 35 | aminoácidos | Variable (VP) | pesada  | 10C1 |
| I2 | 36 | aminoácidos | Variable (VL) | liviana | 10C1 |
| J1 | 37 | nucleótidos | Variable (VP) | pesada  | 3B10 |
| J1 | 38 | aminoácidos | Variable (VP) | pesada  | 3B10 |

Los siguientes ejemplos tienen como intención ilustrar la invención sin limitar su alcance.

**Ejemplo 1: Preparación de globulómeros**



**a) Globulómero A $\beta$ (1-42)**

El péptido sintético A $\beta$ (1-42) (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) al 100% a razón de 6 mg/ml y se incubó hasta su completa solubilización con agitación a 37°C durante 1,5 horas. El HFIP actúa rompiendo los enlaces hidrógeno, y se lo usa para eliminar las heterogeneidades estructurales preexistentes en el péptido A $\beta$ . El HFIP se eliminó por evaporación en un dispositivo SpeedVac, y el A $\beta$ (1-42) se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sonicó durante 20 segundos. El A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP se diluyó en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400  $\mu$ M, y se agregaron 1/10 volúmenes de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (en H<sub>2</sub>O) (con una concentración final de 0,2% de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37°C dio como resultado el globulómero intermediario A $\beta$ (1-42) de 16/20-kDa (forma corta del oligómero globular). El globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con tres volúmenes de H<sub>2</sub>O y una incubación durante 18 horas a 37°C. Después de una centrifugación a 3000 G durante 20 minutos, la muestra se concentró por ultrafiltración (punto de corte: 30 kDa), se dializó contra NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, se centrifugó a 10000 G durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante que comprendía el globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-kDa. Como una alternativa a la diálisis, también puede precipitarse el globulómero A $\beta$ (1-42) 38/48-kDa con un exceso de nueve veces (v/v) de solución metanol/ácido acético fría en hielo (33% de metanol, 4% de ácido acético) durante 1 hora a 4°C. Después se precipitó el globulómero A $\beta$ (1-42) de 38/48-

kDa por centrifugación (10 minutos a 16200 G), se lo resuspendió en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, y se ajustó el pH en 7,4.

**b) Globulómero reticulado  $\text{A}\beta(1-42)$**

El péptido sintético  $\text{A}\beta(1-42)$  (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suiza) se suspendió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) al 100% a razón de 6 mg/ml y se incubó hasta su completa solubilización con agitación a 37°C durante 1,5 horas. El HFIP actúa rompiendo los puentes de hidrógeno, y se lo usó para eliminar las heterogeneidades estructurales preexistentes en el péptido  $\text{A}\beta$ . El HFIP se eliminó por evaporación en un dispositivo SpeedVac, y el  $\text{A}\beta(1-42)$  se resuspendió a una concentración de 5 mM en dimetilsulfóxido y se sonicó durante 20 segundos. El  $\text{A}\beta(1-42)$  pretratado con HFIP se diluyó en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) hasta 400  $\mu\text{M}$ , y se agregaron 1/10 volúmenes de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (en  $\text{H}_2\text{O}$ ) (con una concentración final de 0,2% de SDS). Una incubación durante 6 horas a 37°C dio como resultado el globulómero intermediario  $\text{A}\beta(1-42)$  de 16/20-kDa (forma corta del oligómero globular). El globulómero  $\text{A}\beta(1-42)$  de 38/48-kDa se generó mediante una dilución adicional con tres volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}$  y una incubación durante 18 horas a 37°C. Después se realizó la reticulación del globulómero  $\text{A}\beta(1-42)$  de 38/48-kDa mediante una incubación con glutaraldehído 1 mM durante 2 horas a temperatura ambiente (RT: 21°C), a lo que siguió un tratamiento con etanolamina (5 mM) durante 30 minutos a RT.

**c) Globulómero  $\text{A}\beta(20-42)$**

Se mezclaron 1,59 ml de la preparación de globulómero A $\beta$ (1-42), preparado de acuerdo con el ejemplo 1a, con 38 ml de solución amortiguadora (MES/NaOH 50 mM, pH 7,4) y 200  $\mu$ l de una solución de 1 mg/ml de termolisina (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 20 horas. Luego se agregaron 80  $\mu$ l de una solución de EDTA 100 mM, pH 7,4, en agua, y además, el contenido de SDS de la mezcla se ajustó en 0,01% con 400  $\mu$ l de una solución de SDS con una concentración de 1%. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente 1 ml con un tubo Centriprep de 30 kDa de 15 ml. El concentrado se mezcló con 9 ml de solución amortiguadora (MES/NaOH 50 mM, 0,02% de SDS, pH 7,4) y se concentró nuevamente hasta 1 ml. El concentrado se dializó a 6°C contra 1 l de solución amortiguadora (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 horas. Se ajustó el contenido del dializado en 0,1% con una solución de SDS con una concentración de 2% en agua. La muestra se centrifugó a 10000 G durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, es decir, el globulómero A $\beta$ (20-42).

**d) Globulómero A $\beta$ (12-42)**

Se mezclaron 2 ml de una preparación de globulómero A $\beta$ (1-42), preparada de acuerdo con el ejemplo 1a, con 38 ml de solución amortiguadora (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y 150  $\mu$ l de endoproteinasa GluC a razón de 1 mg/ml (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a RT, y posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l adicionales de endoproteinasa GluC 1 mg/ml (Roche) en agua. La mezcla de reacción se agitó a RT durante otras 16 horas, a lo que siguió el agregado de 8  $\mu$ l de una solución 5 M de DIFP. La mezcla de reacción se concentró hasta

aproximadamente 1 ml por medio de un tubo Centriprep de 30 kDa de 15 ml. El concentrado se mezcló con 9 ml de solución amortiguadora (fosfato de sodio 5 mM, cloruro de sodio 35 mM, pH 7,4) y se concentró nuevamente hasta 1 ml. El concentrado se dializó a 6°C contra 1 l de solución amortiguadora (fosfato de sodio 5 mM, NaCl 35 mM) en un tubo de diálisis durante 16 horas. Se ajustó el contenido del dializado en 0,1% con una solución de SDS con una concentración de 1% en agua. La muestra se centrifugó a 10000 G durante 10 minutos y se separó el sobrenadante, es decir, el globulómero A $\beta$ (12-42).

**Ejemplo 2: Cromatografía de exclusión molecular de diferentes preparaciones de monómero A $\beta$ (1-42) y monómero A $\beta$ (1-40)**

**A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%:**

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem, N° de catálogo H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1% en H<sub>2</sub>O, y se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 G. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

**Muestra de 5 minutos:**

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante que contenía NH<sub>4</sub>OH al 0,1% con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, hasta una concentración de A $\beta$ (1-42) de 0,2 mg/ml. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

**Muestra de 1 hora:**

Se diluyeron 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{A}\beta(1-42)$  en el sobrenadante que contenía  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,1% con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM,  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4, a una concentración de  $\text{A}\beta(1-42)$  de 0,2 mg/ml. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu\text{l}$  por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

**$\text{A}\beta(1-42)$ ,  $\text{HCOOH}$  al 70%:**

Se disolvió 1 mg de  $\text{A}\beta(1-42)$  en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCOOH}$  al 70% en  $\text{H}_2\text{O}$  y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 G. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de  $\text{A}\beta(1-42)$  en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

**Muestra de 5 minutos:**

Se diluyeron 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{A}\beta(1-42)$  en  $\text{HCOOH}$  al 70% a una concentración de 0,2 mg/ml de  $\text{A}\beta(1-42)$  con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM,  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con  $\text{NaOH}$  1 M. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu\text{l}$  por cromatografía de exclusión molecular.

**Muestra de 1 hora:**

Se diluyeron 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{A}\beta(1-42)$  en  $\text{HCOOH}$  al 70% a una concentración de 0,2 mg/ml de  $\text{A}\beta(1-42)$  con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM,  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con  $\text{NaOH}$  1 M. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu\text{l}$  por cromatografía de exclusión molecular.

**$\text{A}\beta(1-42)$ ,  $\text{NaOH}$  al 0,1%:**

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem, N° de catálogo H-1368) en 500  $\mu$ l de NaOH al 0,1% en H<sub>2</sub>O, y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 G. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

**Muestra de 5 minutos:**

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en NaOH al 0,1% a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

**Muestra de 1 hora:**

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en NaOH al 0,1% a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-42) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

**A $\beta$ (1-40), NaOH al 0,1%:**

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-40) (Bachem, N° de catálogo H-1194) en 500  $\mu$ l de NaOH al 0,1% en H<sub>2</sub>O, y se agitó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 G. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

**Muestra de 5 minutos:**

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-40) en NaOH al 0,1% a una concentración de 0,2 mg/ml A $\beta$ (1-40) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se

incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

**Muestra de 1 hora:**

Se diluyeron 20  $\mu$ l de A $\beta$ (1-40) en NaOH al 0,1% a una concentración de 0,2 mg/ml de A $\beta$ (1-40) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se analizaron 100  $\mu$ l por cromatografía de exclusión molecular.

Condiciones para cromatografía de exclusión molecular (SEC):

Columna de SEC: Superose 12 HR 10/300 GL (Amersham, N° de catálogo 17-5173-01)

Flujo: 0,5 ml/minuto

Velocidad del papel: 0,2 cm/minuto

Excoloración a 214 nm: 0-0,2 unidades de absorbancia

Fase móvil: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Los resultados se ilustran en la Figura 1.

La preparación de una solución pura de A $\beta$  monomérico es un gran desafío, debido a la elevada tendencia del péptido A $\beta$ , especialmente el monómero A $\beta$ (1-42), a agregarse en fibrillas. Sin embargo, para el análisis y la caracterización de anti-globulómeros A $\beta$ (20-42) que discriminen monómeros A $\beta$ (1-42) y monómeros A $\beta$ (1-40), es necesario usar la mejor preparación monomérica de A $\beta$  que pueda obtenerse con los medios técnicos disponibles. En este caso se evaluó el efecto del solvente inicial del péptido A $\beta$  sobre el efecto de agregación, después de una dilución adicional en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. El proveedor del péptido A $\beta$  (Bachem) afirma en la

información técnica que A $\beta$ (1-42) ha de solubilizarse en NH<sub>4</sub>OH al 0,1%. Cinco minutos a temperatura ambiente (RT) después de solubilizar el A $\beta$ (1-42) en NH<sub>4</sub>OH y una dilución adicional inmediata 1:10 en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 en la cromatografía de exclusión molecular se observan las primeras señales de agregación de A $\beta$ (1-42) a precursores fibrilares con un pico menor a 74 kD. El A $\beta$ (1-42) monomérico corre con un pico mayor de 11 kD y un hombro a 6 kD. Después de incubar el péptido A $\beta$ (1-42) en NH<sub>4</sub>OH durante una hora a temperatura ambiente (RT), ya se ha agregado en mayor extensión a fibrillas de A $\beta$ (1-42), lo que resulta en una pérdida de material detectable que no ingresa en la columna de cromatografía de exclusión molecular. Si se usa ácido fórmico al 70% como solvente inicial para el péptido A $\beta$ (1-42), se produce un mayor grado de agregación después de 1 hora a RT con solamente una menor fracción de monómero A $\beta$ (1-42) libre (vale destacar que el ácido fórmico por sí solo lleva a una mayor absorción de fondo a la longitud de onda de detección de proteínas). El mejor solvente inicial para A $\beta$ (1-42) para prevenir la agregación es NaOH al 0,1%, que incluso después de 1 hora de incubación, u después de una solubilización y una dilución adicional, solamente presenta una pequeña fracción de A $\beta$ (1-42) agregado, y la mayor parte de A $\beta$ (1-42) aún se halla como monómero. El A $\beta$ (1-40) solubilizado inicialmente en NaOH al 0,1% no presenta signo de agregación alguno, incluso después de 1 hora de incubación a RT.

**Ejemplo 3: Análisis semicuantitativo visualizado por SDS-PAGE de la discriminación de anticuerpos selectivos de globulómero A $\beta$ (20-42) para fibrillas A $\beta$ (1-42)**



**Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42):**

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem, N° de cat. H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1% en H<sub>2</sub>O, y se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 5 minutos a 10000 G. Se recolectó el sobrenadante. Se determinó la concentración de A $\beta$ (1-42) en el sobrenadante de acuerdo con el método de Bradford (BIO-RAD).

Se mezclaron 100  $\mu$ l de A $\beta$ (1-42) en NH<sub>4</sub>OH al 0,1% con 300  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, y se ajustó a pH 7,4 con HCl al 2%. Luego se incubó la muestra a 37°C durante 20 horas. Después, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 10000 G. El sobrenadante se descartó, y el residuo se mezcló con 400  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, se resuspendió con agitación vigorosa ("vortexeado") durante 1 minuto, y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 G. El sobrenadante se descartó, y el residuo se mezcló con 400  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, se resuspendió por agitación vigorosa ("vortexeado") durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 G una vez más. El sobrenadante se descartó. El residuo se resuspendió en 380  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 y se ayudó con agitación vigorosa ("vortexeado").

**Unión de los anticuerpos anti-A $\beta$  a fibrillas A $\beta$ (1-42):**

Se diluyeron 40  $\mu$ l de preparación fibrilar A $\beta$ (1-42) con 160  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,4, y se agitó 5 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10000 G. El sobrenadante se descartó, y el residuo se resuspendió

en 95  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, 0,05% Tween 20, pH 7,4. La resuspensión se realizó por agitación vigorosa ("vortexeado").

Se mezclaron alícuotas de 10  $\mu$ l de la preparación fibrilar cada una con:

- a) 10  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4
- b) 10  $\mu$ l de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de 5F7 en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4
- c) 10  $\mu$ l de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de 6E10 (Signet N° 9320) en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 horas, luego se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 G. Los sobrenadantes se colectaron y se mezclaron con 20  $\mu$ l de solución de muestra SDS-PAGE. Los residuos se mezclaron con 50  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, 0,025% Tween 20, pH 7,4 y se resuspendieron por "vortexeado", luego se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10000 G. Los sobrenadantes se descartaron, y los residuos se mezclaron con 20  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 140 mM, 0,025% Tween 20, pH 7,4, luego con 20  $\mu$ l de solución de muestra SDS-PAGE. Las muestras se sembraron en un gel 4 - 20% Tris/Glicina para electroforesis.

Parámetros para SDS-PAGE:

Solución de muestra SDS: 0,3 g de SDS

4 ml Tris/HCl 1 M, pH 6,8

8 ml de glicerina

1 ml de azul de bromofenol al 1% en etanol

Llevado a 50 ml con  $\text{H}_2\text{O}$

Gel 4-20% Tris/Glicina: (Invitrogen, N° de cat. EC6025BOX)

Amortiguador de electroforesis:

7,5 g de Tris

36 g de glicina

2,5 g de SDS

Llevado a 2,5 l con H<sub>2</sub>O

El gel se analiza a una corriente constante de 20 mA.

Coloración de los geles: Azul de Coomassie R250

Los resultados se ilustran en la Figura 2.

Análisis semicuantitativo de diferentes anticuerpos anti-A $\beta$  y su discriminación de fibrillas A $\beta$ (1-42). Las posiciones de los anticuerpos, fibrillas A $\beta$ (1-42) y monómeros A $\beta$ (1-42) están marcadas en el borde del gel. Debido a su tamaño, las fibrillas A $\beta$ (1-42) no pueden ingresar en el gel SDS-PAGE, y se pueden observar en la cavidad del gel.

1. Marcador
2. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); control
3. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 5F7; 20 horas a 37°C; sobrenadante
4. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 5F7; 20 horas a 37°C; precipitado
5. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 6E10; 20 horas a 37°C; sobrenadante
6. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42); + mAb 6E10; 20 horas a 37°C; precipitado

La unión relativa a las fibrillas tipo A $\beta$  se evaluó con un análisis de SDS-PAGE, midiendo los valores de Densidad Óptica (OD) de las cadenas pesadas de los anticuerpos en la unión fibrilar (fracción precipitado) y las fracciones de sobrenadante después de la centrifugación. Los anticuerpos que se unieron a las fibrillas A $\beta$  deberían coprecipitar con las fibrillas A $\beta$ , y por lo tanto, se encuentran en la fracción precipitada, mientras que los anticuerpos no unidos a fibrillas A $\beta$  (libres) se encuentran en el sobrenadante. El porcentaje de anticuerpo unido a fibrillas A $\beta$  se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de anticuerpo unido a fibrillas A}\beta = \frac{\text{OD}_{\text{fracción fibrilar}} \times 100\%}{(\text{OD}_{\text{fracción fibrilar}} + \text{OD}_{\text{fracción sobrenadante}})}$$

Este procedimiento se realizó para los mAb 6E10 (Signet, N° de cat. 9320), 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1.

En un cerebro con la enfermedad de Alzheimer, las fibrillas A $\beta$  son uno de los componentes principales del conjunto de péptido A $\beta$  total. Al atacar estas fibrillas con anticuerpos anti A $\beta$ , el riesgo de efectos secundarios negativos es elevado, debido a la liberación de grandes cantidades de A $\beta$ , que luego puede incrementar el riesgo de microhemorragias. Se observó un incremento en el riesgo de microhemorragias en un sistema de inmunización activa con agregados fibrilares del péptido A $\beta$  (Bennett y Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12; Orgogozo J, *Neurology*, 2003, 61, 46-54; Schenk et al., 2004, *Curr Opin Immunol*, 16, 599-606).

A diferencia del anticuerpo disponible en forma comercial 6E10 (Signet 9320), que reconoce un epítopo de A $\beta$  linear entre AA1 y 17, el anticuerpo 5F7 selectivo para el globulómero A $\beta$ (20-42) (que en realidad tiene poca

selectividad por los globulómeros A $\beta$ (20-42) en comparación con las otras formas A $\beta$ ) no se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) en un experimento de coprecipitación. Esto se observa por el hecho de que el anticuerpo 5F7 después de una incubación con fibrillas A $\beta$ (1-42) permanece en el sobrenadante después de un paso de precipitación, y no coprecipita por estar unido a las fibrillas A $\beta$ (1-42).

**Ejemplo 4: Análisis del comportamiento cognitivo en ratones por medio de un ensayo de reconocimiento de objeto, después de una inmunización activa con monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1%), globulómero A $\beta$ (1-42) o globulómero A $\beta$ (20-42), en comparación con la cepa salvaje**

En estos experimentos se usaron ratones con sobreexpresión de APP humano con una mutación puntual. La mutación puntual hace referencia al aminoácido 717 (sustitución de isoleucina por valina), y se la ha encontrado en una familia de Londres, donde lleva al inicio de la AD antes del comienzo de la sexta década de vida (Mullan et al., Nature Genetics 2 (1992) 340-342). Los ratones transgénicos, denominados APP/L en la presente documentación, fueron creados y descritos por primera vez en Leuven (Moechars et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 6483-6492). Los ratones APP/L hembra se sometieron a una inmunización activa a las 6 semanas de edad.

Los ratones recibieron 100  $\mu$ g de monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1%), globulómero A $\beta$ (1-42) o globulómero A $\beta$ (20-42) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), mezclado con igual cantidad de coadyuvante de Freund completo en forma intraperitoneal, a lo que siguieron inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de antígeno en coadyuvante de Freund incompleto cada

tres semanas durante tres meses. Durante el transcurso del experimento, los animales se conservaron bajo condiciones convencionales, con ciclos día/noche (14 horas de luz comenzando a las 7 pm/10 horas de oscuridad). El aumento en el peso corporal durante el transcurso del experimento fue tal como se esperaba, y no fue significativamente diferente del grupo control, que recibió PBS/coadyuvante solo, lo que sugiere que los tratamientos con antígeno fueron bien tolerados.

A los 4,5 meses de edad, se estudió la habilidad cognitiva de los ratones por medio de un ensayo de reconocimiento de objeto descrito en la técnica (Dewachter et al., Journal of Neuroscience 22 (2002) 3445-3453). Con este fin, los ratones se acostumbraron a una arena, y luego se expusieron durante 10 minutos a una fase de adquisición, durante la cual se colocaron individualmente en la arena, que ahora contenía dos elementos idénticos (pirámide azul, cubo verde, cilindro amarillo de tamaño similar, aproximadamente 4 cm). Se registró la duración y la frecuencia con la cual el ratón exploró los objetos. Durante la fase de retención, 2,5 horas más tarde, los ratones se colocaron nuevamente en la arena, que ahora contenía, además de los objetos conocidos, un objeto desconocido seleccionado al azar entre otros objetos. El reconocimiento del nuevo objeto se registró como el tiempo en el cual el ratón estuvo explorando el objeto antiguo en relación al tiempo total (exploración del objeto antiguo y nuevo). El "índice de reconocimiento" expresa esta relación (tiempo para el nuevo objeto/tiempo total). Un ratón que no recuerda el objeto conocido lo considerará igualmente interesante que el nuevo objeto, y pasará igual cantidad de tiempo explorándolo, en otras palabras, mostrará un índice de

reconocimiento de 50%. Un ratón que recuerda el objeto conocido lo considerará no interesante, y por lo tanto, tendrá un índice de reconocimiento significativamente mayor. Los ratones APP/L son conocidos por ser presentar deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhibir un índice de reconocimiento en el rango del nivel aleatorio, es decir 50%.

Los resultados se ilustran en la Figura 3.

Prueba de reconocimiento de objeto en ratones. En la prueba se informa el reconocimiento de un objeto conocido en comparación con uno desconocido, medido en términos del comportamiento exploratorio durante una fase de prueba de 10 minutos. El índice de reconocimiento se define como el porcentaje de tiempo que el ratón ocupa explorando un objeto desconocido en relación al tiempo que ocupa explorando ambos objetos. El objeto conocido fue explorado durante una fase de adquisición de 10 minutos, tres horas antes de la fase de prueba. Se compararon cinco grupos de ratones (el número de n se indica debajo de las columnas). Los ratones normales C57Bl/6 (cepa salvaje) presentaron un RI elevado significativamente diferente del nivel aleatorio (50%, es decir, tiempos de exploración iguales transcurridos en ambos objetos, conocido y desconocido) ( $*** = p < 0,001$ ; prueba de Student). Los otros cuatro grupos de ratones transgénicos APP se sometieron a inmunización activa con tres meses de antelación. Los inmunógenos usados fueron el monómero A $\beta$ (1-42), el globulómero A $\beta$ (1-42) y el globulómero A $\beta$ (20-42). Como control se usó solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Las diferencias significativas entre el PBS y los otros grupos se indican con círculos:  $^{\circ} = p < 0,05$ ;  $^{\circ\circ} = p < 0,01$  (prueba de t post-hoc después de  $p < 0,05$  en el ANOVA).

Los ratones APP/L son conocidos por presentar, a diferencia de los ratones no transgénicos, una deficiencia cognitiva a los 4,5 meses de edad, y porque alcanzan resultados cercanos al nivel aleatorio (es decir 50% de índice de reconocimiento). De hecho, los ratones tratados con PBS presentaron un comportamiento aleatorio, a diferencia de los ratones no transgénicos (cepa salvaje). La inmunización con globulómero A $\beta$ (1-42) nativo y con globulómero A $\beta$ (20-42) dio como resultado un reconocimiento de objeto significativamente mejorado en los ratones APP/L.

Debido a que ambas preparaciones de globulómero (nativo y truncado) dieron como resultado una mejora en la memoria de los animales transgénicos APP y un reconocimiento aún mayor en los animales tratados con globulómero A $\beta$ (20-42), es razonable asumir que la inducción de anticuerpos contra el globulómero truncado A $\beta$ (20-42) producirá el mejor resultado, y que la inmunización pasiva con anticuerpos reactivos específicamente con esta especie representa la estrategia de tratamiento óptima.

**Ejemplo 5: Análisis por transferencia puntual del perfil de anticuerpos para diferentes formas de A $\beta$  después de una inmunización activa de ratones Tg APP/L con globulómero A $\beta$ (20-42)**

Después de la inmunización de ratones APP/L (compárese con el ejemplo 4) (Moechars et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 6483-6492) con diferentes formas de A $\beta$ , se evaluaron los anticuerpos anti-A $\beta$  en muestras de plasma. Con este fin, se hicieron diluciones en serie de las formas de A $\beta$ (1-42) individuales en un rango entre 100 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l en PBS suplementado con 0,2 mg/ml de BSA. Se colocó 1  $\mu$ l de cada muestra sobre



una membrana de nitrocelulosa. Para la detección se usaron las muestras de plasma de ratón correspondientes (con una dilución de 1:400). Se hizo una inmunocoloración con IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina y el reactivo de coloración NBT/BCIP.

#### Referencias de A $\beta$ para transferencia puntual:

##### 1. Globulómero A $\beta$ (1-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (1-42) se describe en el ejemplo 1a.

##### 2. Monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68

Se disolvieron 3 mg de A $\beta$ (1-42), (Bachem Inc.; N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de HFIP (suspensión de 6 mg/ml) en un tubo Eppendorf de 1,7 ml y se agitó (mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C hasta que se obtuvo una solución transparente. La muestra se secó en un concentrador SpeedVac (1,5 h) y se resuspendió en 13,2  $\mu$ l de DMSO, se agitó durante 10 segundos, a lo que siguió una sonicación (20 segundos) y una agitación (por ejemplo en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Se agregaron 6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 0,1% de Pluronic F68; pH 7,4, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3000 G. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se disolvió en 0,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 1% de Pluronic F68, pH 7,4. Se agregaron 3,4 ml de H<sub>2</sub>O y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, a lo que siguieron 20 minutos de centrifugación a 3000 G. Se almacenaron ocho alícuotas de 0,5 ml del sobrenadante a -20° para su uso posterior.

##### 3. Globulómero A $\beta$ (20-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (20-42) se describe en el ejemplo 1c.

#### 4. Globulómero A $\beta$ (12-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (12-42) se describe en el ejemplo 1d.

#### 5. Monómero A $\beta$ (1-40) pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO

Se resuspendió 1 mg de A $\beta$ (1-40), (Bachem Inc, N° de cat. H-1194) en 0,25 ml de HFIP (suspensión de 4 mg/ml) en un tubo Eppendorf. El tubo se agitó (por ejemplo, en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C para obtener una solución transparente, y luego se secó en un concentrador Speedvac (1,5 horas). La muestra se disolvió nuevamente en 46  $\mu$ l de DMSO (solución de 21,7 mg/ml = 5 mM), se agitó durante 10 segundos y luego se sonicó durante 20 segundos. Después de 10 minutos de agitación (por ejemplo, en un mezclador Eppendorf Thermo, 1400 rpm), la muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

#### 6. Monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH al 0,1% en H<sub>2</sub>O (preparado fresco) (= 2 mg/ml) y se agitó inmediatamente durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución transparente. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

#### 7. Fibrillas A $\beta$ (1-42)

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc. Catálogo N°: H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1% acuoso (tubo Eppendorf) y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100  $\mu$ l de esta solución preparada fresca A $\beta$ (1-42) con 300  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH

7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con HCl al 1%. La muestra se incubó durante 24 horas a 37°C y se centrifugó (10 minutos a 10000 G). El sobrenadante se descartó, y el precipitado de fibrillas se suspendió nuevamente con 400 µl de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, por vortexeado durante 1 minuto.

#### 8. sAPPα

Obtenido en Sigma (N° de cat. S9564; 25 µg en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPPα se diluyó con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/µl).

Materiales para la transferencia puntual:

Referencias de Aβ:

Dilución en serie de antígenos Aβ en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4+ 0,2 mg/ml de BSA

- 1) 100 pmol/µl
- 2) 10 pmol/µl
- 3) 1 pmol/µl
- 4) 0,1 pmol/µl
- 5) 0,01 pmol/µl

Nitrocelulosa:

Medio Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulosa Pura (0,45 µm); BIO-RAD

Anti-Ratón-AP:

AQ330A (Chemicon)

Reactivo de detección:

Tabletas NBT/BCIP (Roche)

Seroalbúmina Bovina, (BSA):

A-7888 (SIGMA)

Reactivo de bloqueo:

Leche descremada al 5% en TBS

Soluciones amortiguadoras:

TBS

Amortiguador de Tris/HCl 25 mM, pH 7,5

+ NaCl 150 mM

TTBS

Amortiguador de Tris/HCl 25 mM, pH 7,5

+ NaCl 150 mM

+ 0,05% de Tween 20

PBS + 0,2 mg/ml de BSA

Amortiguador de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 7,4

+ NaCl 140 mM

+ 0,2 mg/ml BSA

Solución de anticuerpo I:

Muestras de plasma de ratón de un estudio de inmunización activa con globulímero A $\beta$ (20-42) (dilución 1:400 en 20 ml de leche descremada al 1% en TBS)

Solución de anticuerpo II:

Dilución 1:5000

Anti-ratón-AP en leche descremada al 1% en TBS

Procedimiento de transferencia puntual:

1) Se colocó 1 µl de cada una de las distintas referencias de Aβ (en sus 5 diluciones en serie) en la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

2) Las gotas de referencias de Aβ se dejaron secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (RT) (= transferencia puntual)

3) Bloqueo:

La transferencia puntual se incubó con 30 ml de leche descremada al 5% en TBS durante 1,5 horas a RT.

4) Lavado:

La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a RT.

5) Solución de anticuerpo I:

Se descartó el amortiguador de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante la noche a RT.

6) Lavado:

La solución de anticuerpo I se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a RT. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a RT. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TBS con agitación durante 10 minutos a RT.

7) Solución de anticuerpo II:

El amortiguador de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con solución de anticuerpo II durante 1 hora a RT

8) Lavado:

La solución de anticuerpo II se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a RT. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a RT. La solución de lavado se descartó, y la transferencia puntual se incubó con 20 ml de TBS con agitación durante 10 minutos a RT.

9) Revelado:

La solución de lavado se descartó. Se disolvió 1 tableta de NBT/BCIP en 20 ml de H<sub>2</sub>O y la transferencia puntual se incubó durante 5 minutos con esta solución. El revelado se detuvo por lavado intenso con H<sub>2</sub>O.

Los resultados se ilustran en la Figura 4.

Análisis de transferencia puntual de los anticuerpos anti-A $\beta$  producidos después de la inmunización activa de ratones con el globulómero A $\beta$ (20-42) para evaluar su especificidad para diferentes formas de A $\beta$ . Se colocaron gotas de las formas individuales de A $\beta$  en diluciones en serie, y se las incubó con el plasma de ratón correspondiente que contenía los anticuerpos anti A $\beta$  producidos durante la reacción inmune. Las transferencias puntuales individuales corresponden a distintos ratones inmunizados individuales.

1. Globulómero A $\beta$ (1-42)

2. Monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en 0,1% de Pluronic F68
3. Globulómero A $\beta$ (20-42)
4. Globulómero A $\beta$ (12-42)
5. Monómero A $\beta$ (1-40), pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO
6. Monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%
7. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42)
8. sAPP $\alpha$  (Sigma); (primera aplicación: 1 pmol)

En un estudio de inmunización activa de ratones Tg APP/L se demostró que la inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42) lleva al mejor resultado, ya que alivia el deterioro cognitivo en estos ratones en comparación con el tratamiento con PBS. Las muestras de plasma de ratones Tg APP/L sometidos a una inmunización activa con globulómero A $\beta$ (20-42) presentan un perfil de anticuerpos (reconocimiento predominante de globulómero A $\beta$ (20-42) y globulómero A $\beta$ (12-42)) que se asemeja al de los mAb contra el globulómero A $\beta$ (20-42) que se reivindican en la presente documentación.

**Ejemplo 6: Concentración de los péptidos A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40) solubles e insolubles en extractos de cerebro de ratones Tg APP/PS1 sometidos a una inmunización activa con monómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (20-42) o vehículo como control**

Para este estudio se usaron 40 ratones hembra de un modelo doblemente transgénico de la enfermedad de Alzheimer (ratones Tg APP/PS1), sobre un progenitor FVBxC57Bl/6J, con 4 meses de edad. Los ratones Tg APP/PS1 contienen la forma del aminoácido 695 del APP humano con la

mutación V717I (posición con referencia a la isoforma mayor de APP), junto con el gen de Presenilina 1 humana con la mutación A264E. Ambos genes están bajo el control del promotor Thy1. Los ratones se generaron y se caracterizaron en uno de los laboratorios fundadores de reMYND, Grupo de Genética Experimental, Campus Gasthuisberg, Universidad Católica Leuven, por el Prof. Fred Van Leuven et al.

Se determinaron los genotipos de todos los ratones por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la edad de 3 semanas y recibieron un número de identificación único, una vez que se conocieron los resultados de la PCR.

Los ratones tuvieron libre acceso a agua prefiltrada y estéril (lámpara UV) y alimento convencional para ratón. La comida se almacenó bajo condiciones de sequedad y frío en una habitación de almacenaje bien ventilada. La cantidad de agua y comida se verificó a diario, se proveyó cuando fue necesario, y por defecto, se renovó dos veces por semana.

Los ratones se albergaron con un ritmo alternado de día-noche: 14 horas de luz/10 horas de oscuridad comenzando a las 7 p.m., en jaulas de metal convencionales tipo RVS T2 (área de 540 cm<sup>2</sup>). Las jaulas se equiparon con pisos sólidos y una capa de lecho. La cantidad de ratones por jaula fue limitada de acuerdo a la legislación de bienestar animal. Cinco días antes del inicio de la prueba de comportamiento, los ratones fueron cambiados de jaula a jaulas macrolon Tipo 2, y se transportaron al laboratorio con el objeto de adaptarlos a ambiente del laboratorio durante la preparación para la prueba de comportamiento.



Los ratones recibieron 100 µg de monómero Aβ(1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1%), globulómero Aβ(1-42) o globulómero Aβ(20-42) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) mezclada con igual cantidad de coadyuvante de Freund completo en forma intraperitoneal, a lo que siguieron inyecciones de refuerzo con la misma cantidad de antígeno en coadyuvante de Freund incompleto cada 3 semanas durante 4 meses.

#### Bioquímica

Se determinó el Aβ(1-40) y Aβ(1-42) en la fracción soluble de 1 hemisferio por ELISA. Además, se determinó Aβ(1-40) y Aβ(1-42) por ELISA en la fracción de membrana insoluble de 1 hemisferio.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla 2:1:1 de Ketalar (quetamina), Rompun (xilazina 2%) y atropina, y se sometieron a una descarga transcardíaca con suero fisiológico a 4°C. Esto se realizó para quitar la sangre de los vasos cerebrales, un procedimiento que no tiene influencia sobre la integridad del órgano.

Se recolectó fluido cerebroespinal (CSF) a través de una incisión en los músculos del cuello, entre el cráneo y la primera vértebra cervical. Se hizo una punción en la cisterna magna con una aguja de calibre 26 y se colectaron entre 10 y 20 µl de CSF con una pipeta de vidrio fina.

La sangre se recolectó por punción cardíaca con una jeringa de 1 ml en tubos Eppendorf recubiertos con heparina. La sangre se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El suero se almacenó a -70°C.

Los ratones se lavaron en forma intracardíaca con suero fisiológico a 4°C.

El cerebro se extrajo del cráneo, y se separó el cerebelo del cerebro anterior con un corte en el plano coronal/frontal. El cerebelo fue descartado. El cerebro anterior se dividió de manera uniforme en hemisferio izquierdo y derecho por medio de un corte sagital en la línea media.

Inmediatamente, se sumergió un hemisferio en nitrógeno líquido y se lo almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis bioquímico.

#### Homogenización y fraccionamiento de un hemisferio cerebral

El cerebro se homogenizó usando un vástago Potter, un tubo de vidrio (libre de detergente,  $2\text{ cm}^3$ ) y un homogenizador mecánico (650 rpm). Como amortiguador de homogenización se usó un volumen de  $6,5 \times \frac{1}{2}$  peso de cerebro de amortiguador de Tris/HCl 20 mM (pH 8,5) preparada fresca con inhibidores de proteasas (1 tableta cada 50 ml de solución amortiguadora Tris/HCl, Complete<sup>TM</sup>, Roche, Mannheim, Alemania).

Las muestras se transfirieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  a un soporte de muestras con nitrógeno líquido, y cada muestra individual se precalentó incubándola en la mesada durante unos segundos antes de la homogenización. Los homogenatos se recolectaron en tubos de centrifuga TLX Beckman y se colocaron en hielo antes de la centrifugación. Entre las dos muestras, el vástago Potter y el tubo de vidrio se lavaron cuidadosamente con agua destilada (AD) sin detergentes, y se secaron con papel absorbente.

Las muestras se centrifugaron en una ultracentrifuga preenfriada (Beckman, Mannheim, Alemania) durante 1 hora y 20 minutos a 48000 rpm ( $135000 \times G$ ) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Debido a la cantidad limitada de soportes de centrifuga ( $N = 8$ ), las muestras se clasificaron en función del peso de cerebro (para

equilibrar la centrifuga) y se separaron al azar, con el objetivo de dividir los diferentes grupos de tratamiento en las diferentes sesiones de centrifugación.

El sobrenadante (fracción soluble conteniendo los péptidos secretados APP y amiloide) se separó del precipitado (fracción de membrana conteniendo los fragmentos APP unidos a membrana y los péptidos amiloides asociados a placas en el caso de ratones ancianos). El sobrenadante se dividió en dos tubos, uno de los cuales se almacenó a -20°C como reserva, y el otro se procesó adicionalmente para cromatografía en columna para concentrar los péptidos amiloides.

En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, los pesos de los cerebros, el volumen de solución amortiguadora Tris/HCl usado, las sesiones de centrifugación (marcadas con color) y el volumen de fracción usado para la cromatografía en columna.

| Nº de Muestra | Tratamiento | Nº ID de ratón | Peso de cerebro (W) (mg) | V Tris (=W x 6,5) (µl) | 50% V Tris (µl)) |
|---------------|-------------|----------------|--------------------------|------------------------|------------------|
| 19            | X           | TAB.TPF 1305   | 157,8                    | 1026                   | 513              |
| 21            | X           | TAB.TPF 1335   | 160,2                    | 1049                   | 521              |

Se montaron columnas de fase invertida pequeñas (C18-Sep-Pak Vac 3cc cartridges, Waters, Massachusetts, MA) en un sistema de vacío y se las lavó con acetonitrilo al 80% en ácido trifluoroacético al 0,1% (A-TFA) seguido por TFA al 0,1% dos veces. Después, las muestras se aplicaron a las columnas y se lavaron sucesivamente con A-TFA al 5% y 25%. Los péptidos amiloides se eluyeron con A-TFA al 75%, y las fracciones eluidas se recolectaron en tubos

de 2 ml sobre hielo. Las fracciones eluidas se secaron en frío en un concentrador SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY) durante la noche y se disolvieron nuevamente en 330 µl del diluyente de muestra proporcionado con los conjuntos de elementos de ELISA.

Adicionalmente, los precipitados se fraccionaron en diferentes fracciones de membrana: la fracción de membrana A (MFA), la fracción de membrana B (MFB), que contenía APP completo, y la fracción de membrana C (MFC), que contenía el amiloide asociado a placas. Por lo tanto, los precipitados se disolvieron en solución amortiguadora TBS con inhibidores de proteasas (1 tableta cada 50 ml de solución amortiguadora TBS, Complete™, Roche, Mannheim, Alemania), y la MFA se dividió en dos tubos, de los cuales uno se almacenó a -20°C como reserva. 60% de la MFA se sometió a un procesamiento adicional con el agregado de NP40 (2% de volumen final) y Tritón X-100 (2% de volumen final) en TBS con inhibidores de proteasas y se centrifugó durante una hora a 27000 rpm (98000 x G) en una ultracentrífuga Beckman a 4°C usando un rotor oscilante (SW60). El sobrenadante (MFB) se separó del precipitado (MFC), y ambos se almacenaron a -20°C.

En la siguiente tabla se indican, a modo de ejemplo, los pesos de los cerebros, 60% del peso de cada cerebro, los volúmenes de solución amortiguadora TBS + PI + NP40 + Tritón X-100 usados en las sesiones de centrifugación (marcadas con colores).

| Nº de Muestra | Tratamiento | Nº ID de ratón | Peso de cerebro (W) (mg) | 3/5 x Peso de | Volumen de solución amortiguadora |
|---------------|-------------|----------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
|---------------|-------------|----------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|

|    |   |              |       | cerebro<br>(mg) | = 3/5 W x 15<br>(µl) |
|----|---|--------------|-------|-----------------|----------------------|
| 19 | X | TAB.TPF 1305 | 157,8 | 95              | 1420                 |
| 21 | X | TAB.TPF 1335 | 160,2 | 96              | 1442                 |

ELISA de Aβ humano en la fracción soluble de un hemisferio

Para cuantificar la cantidad de Aβ(1-40) humano y Aβ(1-42) humano en la fracción soluble de los homogenatos de cerebro y/o en fluido cerebroespinal (CSF), se usaron conjuntos de elementos de ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA) disponibles en forma comercial (ELISA de alta sensibilidad h Amyloid β40 o β42, The Genetics Company, Zurich, Suiza). El ELISA se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se prepararon referencias (una dilución de Aβ(1-40) o Aβ(1-42) sintético) y muestras en una placa de polipropileno de 96 cavidades sin la capacidad de unir proteínas (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania). Se prepararon diluciones de referencia con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml, y las muestras, en el diluyente de muestra proporcionado con el conjunto de elementos para ELISA, con un volumen final de 60 µl. Debido a que los niveles de amiloide aumentan con la edad en el ratón, y debido a que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva de referencia, las muestras para el análisis de Aβ(1-40) se sometieron a una dilución de 1:3, las muestras para el análisis de Aβ(1-42) se sometieron a una dilución de 1:6.

Las muestras, las referencias y los blancos (50 µl) se agregaron a la placa de poliestirol recubierta con anti-Aβ (el anticuerpo de captura reconoce

selectivamente el extremo C terminal del antígeno), que además contenía un anticuerpo conjugado anti-A $\beta$  selectivo (anticuerpo de detección biotinilado), y se incubaron durante una noche a 4°C con el objetivo de permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se agregó un Conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa, seguido después de 30 minutos por el agregado de una mezcla de TMB/peróxido, lo que resultó en la conversión del sustrato a un producto coloreado. Esta reacción se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico (1 M) y se midió la intensidad del color por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de A $\beta$  de las muestras se realizó comparando la absorbancia con la curva de referencia preparada con A $\beta$ (1-40) sintético o A $\beta$ (1-42).

A $\beta$  humano por ELISA en la fracción insoluble de un hemisferio

Para cuantificar la cantidad de A $\beta$ (1-40) humano y A $\beta$ (1-42) humano en la fracción de membrana insoluble de los homogenatos de cerebro, las muestras de MCF se sometieron a un procesamiento adicional y se disolvieron en Guanidina 8 M en Tris/HCl 80 mM. Después, las muestras se incubaron durante 3 horas en un termomezclador a 25°C y se pipetearon hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de 100  $\mu$ l cada hora para disolver el precipitado de MFC en el amortiguador de guanidina. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante sólo 1 minuto a 4000 rpm para eliminar los desechos.

El peso de los cerebros, el peso del precipitado de MFC y el volumen de amortiguador de guanidina 8 M se indican a modo de ejemplo en la siguiente tabla.

| Muestra N° | Tratamiento | ID de Ratón | Peso | Peso | Volumen |
|------------|-------------|-------------|------|------|---------|
|------------|-------------|-------------|------|------|---------|

|    |  |             | cerebro(W)<br>(mg) | Precipitado<br>MCF<br>(WMCf)<br>(cerebro<br>40%) | Guanidina 8<br>M<br>(WMCf x 1,6)<br>(µl) |
|----|--|-------------|--------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 19 |  | TAB.TPF1305 | 157,8              | 63                                               | 101                                      |
| 21 |  | TAB.TPF1335 | 160,2              | 64                                               | 103                                      |

Para cuantificar la cantidad de Aβ(1-40) humano y Aβ(1-42) humano en las muestras finales, se usaron los conjuntos de elementos disponibles comercialmente para Inmunoensayos Ligados a Enzima (ELISA) (ELISA de alta sensibilidad h Amyloid β40 o β42, The Genetics Company, Zurich, Suiza). El ELISA se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto para la preparación de las referencias (una dilución de Aβ(1-40) o Aβ(1-42) sintéticos). Las muestras se prepararon en el diluyente de muestras proporcionado con el conjunto de componentes para ELISA, con un volumen final de 60 µl. Debido a que la guanidina influye sobre los valores de DO de la curva de referencia, se prepararon diluciones de referencia con concentraciones finales de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 pg/ml en diluyente para muestras con la misma concentración de guanidina que para las muestras. Esto se llevó a cabo en una placa de polipropileno de 96 cavidades sin la capacidad de unir proteínas (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania).

Debido a que los niveles de amiloide aumentan con la edad del ratón, y debido a que la evaluación real requiere que las lecturas de las muestras estén dentro de la parte lineal de la curva de referencia, las muestras para el análisis

de A $\beta$ (1-40) insoluble y A $\beta$ (1-42) insoluble se sometieron a una dilución de 1:500.

Las muestras, las referencias y los blancos (50  $\mu$ l) se agregaron a la placa de poliestirol recubierta con anti-A $\beta$  (el anticuerpo de captura reconoce selectivamente el extremo C terminal del antígeno) , que además contenía un anticuerpo conjugado anti-A $\beta$  selectivo (anticuerpo de detección biotinilado), y se incubaron durante una noche a 4°C con el objetivo de permitir la formación del complejo anticuerpo-amiloide-anticuerpo. Al día siguiente, se agregó un Conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa, seguido después de 30 minutos por el agregado de una mezcla de TMB/peróxido, lo que resultó en la conversión del sustrato a un producto coloreado. Esta reacción se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico (1 M) y se midió la intensidad del color por medio de fotometría con un lector de ELISA con un filtro de 450 nm. La cuantificación del contenido de A $\beta$  de las muestras se realizó comparando la absorbancia con la curva de referencia preparada con A $\beta$ (1-40) sintético o A $\beta$ (1-42).

Los resultados se ilustran en la Figura 5

Concentración de péptidos A $\beta$ (1-42) y A $\beta$ (1-40) solubles e insolubles en extractos de cerebro de ratones APP/PS1 Tg sometidos a una inmunización activa, ya sea con monómero A $\beta$ (1-42) (NH<sub>4</sub>OH al 0,1%), globulómero A $\beta$ (1-42), globulómero A $\beta$ (20-42), o bien con vehículo como control.

En las fracciones soluble e insoluble de un extracto de cerebro de ratones APP/PS1 Tg sometidos a una inmunización activa con globulómero A $\beta$ (20-42), el nivel de péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) no es significativamente diferente al del control con vehículo. Por el contrario, la inmunización con



globulómero A $\beta$ (1-42) y monómero A $\beta$ (1-42) conduce a una reducción en los niveles cerebrales de A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42). Esto demuestra que la opción de inmunización con el globulómero A $\beta$ (20-42) no altera los niveles totales de A $\beta$  en cerebro en forma significativa, pero sin embargo es efectiva en la mejoría de los trastornos cognitivos relacionados con el péptido A $\beta$  (véase el ejemplo 4).

**Ejemplo 7: Análisis del desempeño cognitivo con la prueba de reconocimiento de objetos en ratones transgénicos APP/L, después de inmunización pasiva con anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ (20-42)**

En estos experimentos se usaron ratones que sobreexpresan APP humana con una mutación puntual. La mutación puntual hace referencia al aminoácido 717 (sustitución de isoleucina por valina), y se la ha encontrado en una familia de Londres, donde lleva al inicio de la AD antes del comienzo de la sexta década de vida (Mullan et al., Nature Genetics 2 (1992) 340-342). Los ratones transgénicos, de aquí en adelante denominados APP/L, fueron creados y descritos por primera vez en Leuven (Moechars et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 6483-6492). Los ratones APP/L hembra se sometieron a una inmunización activa a los 3 meses de edad. Los ratones recibieron 250  $\mu$ g de alguno de los anticuerpos monoclonales de ratón 5F7, 10F11 o 7C6 en 100  $\mu$ l de solución salina amortiguada con fosfato (PBS). A lo largo del transcurso del experimento, los animales se mantuvieron bajo condiciones convencionales en un ciclo de día/noche invertido (14 horas de luz, comenzando a las 7 pm/10 horas de oscuridad). Los ratones toleraron bien la inmunización pasiva, sin ninguna señal de efectos adversos.

Después de la tercera inyección (día 15 de experimento), se probó la habilidad cognitiva de los ratones mediante una prueba de reconocimiento de objetos, tal como se describe en la técnica (Dewachter et al. *Journal of Neuroscience* 22 (2002) 3445-3453). Para este fin, los ratones se familiarizaron a una plataforma y se expusieron durante 10 minutos en una fase de adquisición, durante la que se los colocó individualmente en la plataforma, que ahora contenía dos elementos idénticos (cubo verde o cilindro anaranjado de tamaño similar, aproximadamente 4 cm). Se registró la duración y la frecuencia con la que el ratón exploraba los objetos. Durante la fase de retención, 2,5 horas después, los ratones se colocaron nuevamente la plataforma, que ahora contenía, además del objeto conocido, otro objeto. Se registró el reconocimiento del objeto nuevo como el tiempo que el ratón demoraba explorando el objeto antiguo, en relación al tiempo total (exploración de objeto nuevo y viejo). El "índice de reconocimiento" expresa esta relación (tiempo para objeto nuevo/tiempo total). Un ratón que no recuerda el objeto conocido considerará que es igual de interesante que el objeto nuevo, y pasará una cantidad de tiempo igual en su exploración, en otras palabras, mostrará un índice de reconocimiento de 50%. Un ratón que recuerda el objeto conocido considerará que no es interesante, y por lo tanto, presentará un índice de reconocimiento significativamente mayor. Se sabe que los ratones APP/L presentan deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhiben un índice de reconocimiento en la dimensión del nivel aleatorio, es decir, 50%.

Los resultados se ilustran en la Figura 6.

Reconocimiento de objetos en ratones. En la prueba se informa el reconocimiento de un objeto conocido en comparación con uno desconocido, medido en términos de comportamiento de exploración durante una fase de prueba de 10 minutos. El índice de reconocimiento se define como el porcentaje de tiempo que el ratón ocupa explorando el objeto desconocido en relación al tiempo que pasa explorando ambos objetos. El objeto conocido fue explorado por el ratón durante una fase de adquisición de 10 minutos, 2,5 horas antes de la fase de prueba.

a) Se inmunizaron ratones transgénicos APP una vez a la semana durante tres semanas con una inyección intraperitoneal de 250  $\mu$ g del anticuerpo 5F7 (n = 9), el anticuerpo 10F11 (n = 11) o el anticuerpo 7C6 (n = 11); los animales control recibieron PBS (n = 6). Las diferencias significativas contra el nivel aleatorio (50%, es decir, un tiempo de exploración igual transcurrido con el objeto conocido y el desconocido) se indican con asteriscos. \* =  $p < 0,05$  (prueba t)

b) Comparación de todos los ratones tratados con anticuerpos (5F7, 10F11 y 7C6; (n = 31)) y ratones tratados con solución salina amortiguada con fosfato (PBS; n = 6). El RI del grupo tratado con anticuerpo fue significativamente diferente del nivel aleatorio (\*\* =  $P < 0,01$ ; prueba t).

Se sabe que los ratones APP/L presentan deficiencias cognitivas a los 4,5 meses de edad y exhiben un índice de reconocimiento en la dimensión del nivel aleatorio, es decir, 50%.

Efectivamente, los ratones tratados con PBS presentaron un comportamiento al azar. La inmunización pasiva con los tres anticuerpos (5F7,

10F11 y 7C6) resultó en un incremento marcado del índice de reconocimiento. Comparados con los controles como un solo grupo, el índice de reconocimiento se incrementó en forma significativa. Este efecto beneficioso sobre el desempeño de la memoria de los ratones APP/L después de la administración de los tres anticuerpos sugiere que un anticuerpo contra el globulómero A $\beta$ (20-42) truncado es suficiente para obtener una mejora de la cognición.

**Ejemplo 8: Perfil de transferencia puntual de la selectividad de los anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ (20-42)**

Con el objetivo de caracterizar la selectividad de los anticuerpos monoclonales anti-globulómero A $\beta$ (20-42), se los evaluó para determinar el reconocimiento de diferentes formas de A $\beta$ . Para este objetivo, se hicieron diluciones en serie de las formas individuales de A $\beta$ (1-42) en el rango de entre 100 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l, en PBS suplementado con 0,2 mg/ml de BSA. Se transfirió 1  $\mu$ l de cada muestra a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección se usó el anticuerpo correspondiente (0,2  $\mu$ g/ml). La inmunocoloración se hizo usando anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa y el reactivo de coloración, sustrato BM Blue POD (Roche).

Referencias de A $\beta$  para la transferencia puntual:

1. monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml NH<sub>4</sub>OH al 0,1% en H<sub>2</sub>O (recién preparado) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución límpida. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

2. monómero A $\beta$ (1-40), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%

Se disolvieron 1 mg de A $\beta$ (1-40) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml NH<sub>4</sub>OH al 0,1% en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución límpida. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

3. monómero A $\beta$ (1-42), NaOH al 0,1%

Se disolvieron 2,5 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NaOH al 0,1% en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 5 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución límpida. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

4. monómero A $\beta$ (1-40), NaOH al 0,1%

Se disolvieron 2,5 mg de A $\beta$ (1-40) (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml de NaOH al 0,1% en H<sub>2</sub>O (recién preparada) (= 5 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución límpida. La muestra se almacenó a -20°C para su uso posterior.

5. globulómero A $\beta$ (1-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (1-42) se describe en el ejemplo 1a.

6. Globulómero A $\beta$ (12-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (12-42) se describe en el ejemplo 1d.

7. Globulómero A $\beta$ (20-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (20-42) se describe en el ejemplo 1c.

8. Fibrillas A $\beta$ (1-42)

Se disolvió 1 mg de A $\beta$ (1-42) (Bachem Inc. N° de cat. H-1368) en 500  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH al 0,1% acuoso (tubo Eppendorff) y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100  $\mu$ l de esta solución de A $\beta$ (1-42) recién preparada con 300  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con 1% de HCl. La muestra se incubó durante 24 h a 37°C y se centrifugó (10 minutos a 10000 G). El sobrenadante se descartó y se resuspendió el precipitado de fibrillas con 400  $\mu$ l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4 por vortexeado durante 1 minuto.

#### 9. sAPP $\alpha$

Proporcionado por Sigma (N° de catálogo S9564; 25  $\mu$ g en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). El sAPP $\alpha$  se diluyó a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/ $\mu$ l) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA.

Materiales para la transferencia puntual:

Referencias de A $\beta$ :

Dilución en serie de antígenos A $\beta$  en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + 0,2 mg/ml de BSA

- 1) 100 pmol/ $\mu$ l
- 2) 10 pmol/ $\mu$ l
- 3) 1 pmol/ $\mu$ l
- 4) 0,1 pmol/ $\mu$ l
- 5) 0,01 pmol/ $\mu$ l

Nitrocelulosa:

Medio Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulosa Pura (0,45  $\mu$ m); BIO-RAD

Anti-POD de Ratón:

Nº de catálogo: 715-035-150 (Jackson Immuno Research)

Reactivo de detección:

Sustrato BM Blue POD, precipitante (Roche)

Albúmina de suero bovino (BSA):

Nº de catálogo: A-7888 (SIGMA)

Reactivo de bloqueo:

5% de leche descremada en TBS

Soluciones amortiguadoras:

TBS

25 mM de amortiguador de Tris/HCl, pH 7,5

+ NaCl 150 mM

TTBS

25 mM de amortiguador de Tris/HCl, pH 7,5

+ NaCl 150 mM

+ 0,05% de Tween 20

PBS + 0,2 mg/ml de BSA

Amortiguador de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 7,4

+ NaCl 140 mM

+ 0,2 mg/ml de BSA

Solución de anticuerpo I:

0,2  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo diluido en 20 ml de leche  
descremada al 1% en TBS

Solución de anticuerpo II:

Dilución 1:5000

Anti-POD de Ratón en leche descremada al 1% en TBS

Procedimiento para la transferencia puntual:

1) Se transfirió 1  $\mu$ l de cada una de las distintas referencias de A $\beta$  (en sus 5 diluciones en serie) a la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

2) Las referencias de A $\beta$  se dejaron secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (RT) (= transferencia puntual)

3) Bloqueo:

La transferencia puntual se incubó con 30 ml de leche descremada al 5% en TBS durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

4) Lavado:

Se descartó la solución de bloqueo, y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5) Solución de anticuerpo I:

Se descartó el amortiguador de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante 2 horas a temperatura ambiente

6) Lavado:

Se descartó la solución de anticuerpo I y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la solución de lavado y se incubó la



transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

7) Solución de anticuerpo II:

Se descartó el solución amortiguador de lavado y se incubó la transferencia puntual con solución de anticuerpo II durante una noche a temperatura ambiente

8) Lavado:

Se descartó la solución de anticuerpo II y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la solución de lavado y se incubó la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

9) Revelado:

Se descartó la solución de lavado. Se reveló la transferencia puntual con 10 ml de Sustrato BM Blue POD durante 10 minutos. Se detuvo el relevado mediante el lavado intensivo de la transferencia puntual con  $H_2O$ . La evaluación cuantitativa de la intensidad de las transferencias se realizó usando un análisis por densitómetro (densitómetro GS800 (BioRad) y el conjunto de software Quantity one, Versión 4.5.0 (BioRad)). Solo se evaluaron las transferencias que presentaron una densidad

relativa mayor que 20% de la densidad relativa de la última transferencia del globulómero A $\beta$ (20-42) identificado por medios ópticos sin ambigüedad. Se determinó este valor umbral para cada transferencia puntual en forma independiente. El valor calculado indica la relación entre el reconocimiento del globulómero A $\beta$ (20-42) y la forma de A $\beta$  respectiva para el anticuerpo dado.

Los resultados se ilustran en la Figura 7.

Análisis por transferencia puntual de la especificidad de diferentes anticuerpos anti-A $\beta$  (6E10, 5F7, 4B7, 10F11, 6A2, 4D10, 2F2; 3B10, 7C6, 7E5, 10C1) por diferentes formas de A $\beta$ .

Los anticuerpos monoclonales probados se obtuvieron (excepto por 6E10) mediante la inmunización activa de ratones con el globulómero A $\beta$ (20-42), seguida por la selección de las células de hibridoma fusionadas. Las formas individuales de A $\beta$  se aplicaron en diluciones en serie y se incubaron con los anticuerpos respectivos para provocar la reacción inmune.

1. Monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%
2. Monómero A $\beta$ (1-40), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%
3. Monómero A $\beta$ (1-42), NaOH al 0,1%
4. Monómero A $\beta$ (1-40), NaOH al 0,1%
5. Globulómero A $\beta$ (1-42)
6. Globulómero A $\beta$ (12-42)
7. Globulómero A $\beta$ (20-42)
8. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42)
9. sAPP $\alpha$  (Sigma); (primera transferencia: 1 pmol)

Los anticuerpos monoclonales selectivos anti globulómero A $\beta$ (20-42) pueden dividirse en 3 clases con relación a la discriminación del globulómero A $\beta$ (1-42) y el globulómero A $\beta$ (12-42). La primera clase, que comprende los anticuerpos 6A2, 5F7 y 2F2, reconoce con preferencia al globulómero A $\beta$ (20-42), y en alguna extensión al globulómero A $\beta$ (1-42) (y también al globulómero A $\beta$ (12-42)). La segunda clase, que comprende los anticuerpos 10F11, 4D10 y 3B10, reconoce con preferencia al globulómero A $\beta$ (20-42), y también reconoce al globulómero A $\beta$ (12-42), pero en una menor extensión y no reconoce significativamente al globulómero A $\beta$ (1-42). La tercera clase, que comprende los anticuerpos 7C6, 4B7, 7E5 y 10C1, reconoce al globulómero A $\beta$ (20-42) pero no muestra un reconocimiento significativo por los otros. Las tres clases no reconocen significativamente al A $\beta$ (1-42) monomérico, al A $\beta$ (1-40) monomérico, a las fibrillas A $\beta$ (1-42) o a sAPP $\alpha$ .

El perfil de selectividad de los anticuerpos anti-globulómero A $\beta$ (20-42) muestra que el índice de reconocimiento significativamente elevado en la inmunización pasiva (en Figura 6) se debe principalmente a un reconocimiento selectivo del globulómero A $\beta$ (20-42) y el globulómero A $\beta$ (12-42) truncados, y en una extensión mucho menor, al globulómero A $\beta$ (1-42), y no al A $\beta$ (1-42) monomérico, el A $\beta$ (1-40) monomérico, las fibrillas A $\beta$ (1-42) o sAPP $\alpha$ .

**Ejemplo 9: análisis *in situ* de la reacción específica de anticuerpos selectivos A $\beta$ (20-42) contra el péptido A $\beta$  fibrilar en forma de placas A $\beta$  en ratones TG2576 viejos, y el amiloide A $\beta$  en vasos de las meninges**

Para estos experimentos se usó material de cerebro de ratones TG2576 de 19 meses de edad (Hsiao et al., 1996, Science; 274(5284), 99-102) o de

ratones APP/LxPS1 de 9 meses de edad (como se describió con anterioridad; ReMYND, Leuven, Bélgica), o material de autopsia de dos pacientes con enfermedad de Alzheimer (RZ16 y RZ55; obtenidos de BrainNet, Munich). Los ratones sobreexpresan APP humana con la denominada mutación sueca (K670N/M671L; Tg2576) o la denominada mutación de Londres (V717I), junto con el gen de Presenilina 1 humano con la mutación A264E (APP/LxPS1) y depósitos  $\beta$  amiloides formados en el parénquima cerebral a una edad de aproximadamente entre 7 y 11 meses de edad, y depósitos  $\beta$  amiloides en vasos cerebrales mayores a una edad de aproximadamente 18 meses de edad (Tg2576). Los animales se sometieron a una anestesia profunda y una perfusión transcardiaca con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 0,1 M para lavar la sangre. Luego se extrajeron los cerebros del cráneo y se los dividió en forma longitudinal. Se congeló rápidamente un hemisferio del cerebro, el otro se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4%. El hemisferio fijado por inmersión se crioprotegió sumergiéndolo en sacarosa al 30% en PBS y se montó en un micrótomó con congelación. Se cortó el cerebro anterior completo en secciones de 40  $\mu$ m que se colectaron en PBS y se usaron para el subsiguiente procedimiento de coloración. El material cerebral humano era un bloque de neocorteza de alrededor de 1 cm<sup>3</sup> congelado rápidamente. Una pequeña parte del bloque se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4%, y luego se trató como el material de cerebro de ratón.

Las secciones individuales se colorearon con rojo Congo usando el siguiente protocolo:

Material:

- Conjunto de componentes para el marcado del péptido amiloide rojo Congo (Sigma-Aldrich; HT-60), que consiste en una solución alcohólica de NaCl, solución de NaOH y solución de rojo Congo

- cubetas de coloración.
- portaobjetos y cubreobjetos para microscopio SuperfrostPlus
- Etanol, Xilol, medio para embeber.

Reactivos:

- NaOH en una dilución 1:100 con solución de NaCl, lo que resulta en una solución salina alcalina

- solución salina alcalina en una dilución 1:100 con solución de rojo Congo, lo que resulta en una solución alcalina de rojo Congo (preparada no más de 15 minutos antes de su uso, filtrada)

- se montan las secciones en los portaobjetos y se las deja secar
- se incuba el portaobjetos en una cubeta de coloración, primero durante 30-40 minutos en solución salina alcalina, luego durante 30-40 minutos en solución de rojo Congo alcalina

- se lava tres veces con etanol fresco y se embebe con xilol

Primero se fotografió la coloración usando un microscopio Zeiss Axioplan y se realizó una evaluación cualitativa. El color rojo indicó depósitos de péptido amiloide en forma de placas y en los grandes vasos meníngeos. Estos resultados se ilustran en la Fig. 8A. Más adelante, la evaluación de la coloración del anticuerpo se centró en estas estructuras.

La coloración de los anticuerpos se llevó a cabo incubando las secciones con una solución con entre 0,07 y 7,0 µg/ml del anticuerpo respectivo de acuerdo con el siguiente protocolo:

**Materiales:**

- solución de lavado TBST (solución salina amortiguada con Tween 20; con una concentración 10x; DakoCytomation; S3306 1:10 en agua bidestilada)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en metanol
- suero de burro (Serotec), 5% en TBST
- anticuerpo monoclonal de ratón anti-globulómero diluido en TBST
- anticuerpo secundario: anticuerpo biotinilado de burro anti-ratón (Jackson Immuno; 715-065-150; diluido 1:500 en TBST)
- StreptABComplex (DakoCytomation; K 0377)
- Conjunto de componentes de sustrato para peroxidasa de diaminobenzidina (= DAB; Vector Laboratories; SK-4100)
- portaobjetos y cubreobjetos para microscopio SuperFrost Plus
- medio para embeber libre de xilol (Meditex; X-tra Kitt)

**Procedimiento:**

- se transfieren las secciones flotantes a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% enfriada en hielo y se incuba durante 30 minutos
- se lava durante 5 minutos en amortiguador TBST
- se incuba con suero de burro/TBST durante 20 minutos
- se incuba con anticuerpo primario durante 24 horas a temperatura ambiente
- se lava en amortiguador de TBST durante 5 minutos

- se incuba con suero de bloqueo del conjunto de componentes de peroxidasa Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- se lava en amortiguador de TBST durante 5 minutos
- se incuba con anticuerpo secundario durante 60 minutos a temperatura ambiente
- se lava en amortiguador de TBST durante 5 minutos
- se incuba con StreptABComplex durante 60 minutos a temperatura ambiente
- se lava en amortiguador de TBST durante 5 minutos
- se incuba con DAB del conjunto de componentes de peroxidasa Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- se monta la sección en portaobjetos, se secar al aire, se deshidrata con alcohol y se embebe

Además de la inspección visual de las tinciones, se cuantificó la coloración de las placas mediante la extracción gráfica de 10 placas elegidas al azar de las imágenes histológicas usando el sistema de análisis de imágenes ImagePro 5.0, y se determinó su valor promedio en una escala de grises. Se calcularon los valores de densidad óptica a partir de los valores en escala de grises, sustrayendo la densidad de fondo promedio del material coloreado de la densidad de las placas amiloides (0%: ausencia coloración de placas sobre el fondo circundante, 100%: ausencia de transmisión/coloración máxima), y se evaluaron las diferencias entre el control y los anticuerpos, y entre 6G1 y los anticuerpos selectivos para A $\beta$ (20-42), respectivamente, para observar su significación estadística mediante ANOVA.

Los resultados de las tinciones en ratones Tg2576 y APP/LxPS1 se ilustran en las Figura 8 B-D y H.

Unión de diferentes anticuerpos en una concentración de 0,7 µg/ml en una sección transversal de neocorteza de ratones TG 2576 transgénicos de 19 meses de edad:

C) Los depósitos de Aβ parenquimáticos (placas amiloides) se colorearon solamente con 6G1 y 6E10, pero no con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

D) Todos los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1) presentaron una coloración significativamente menor de las placas de parénquima en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles 6E10 y 4G8.

Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de entre 0,07 y 7,0 µg/ml en sección transversal de neocorteza de ratones APP/LxPS1 transgénicos a los 11 meses de edad:

E) Los depósitos de Aβ en parénquima (placas amiloides) presentaron una coloración significativamente mayor a concentraciones menores con 6G1, 6E10 y 4G8 que con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

Todos los depósitos amiloides se habían verificado con antelación con una coloración congofilica (Congo Red; véase la Fig. 8A). Barra = 100 µm.



La evaluación de los depósitos de DAB marrones demostró que los anticuerpos no selectivos para A $\beta$  6G1 y 6E10 colorearon las placas y los vasos menígeos, mientras que los anticuerpos selectivos para el globulómero A $\beta$ (20-42) 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1 no lo hicieron. Este descubrimiento demuestra que no hay unión a las fibrillas A $\beta$  u otras especies de A $\beta$  presentes en las estructuras amiloides in vivo, o que dicha unión es marcadamente menor para los anticuerpos mencionados. Se supone que esta unión reducida reduce el peligro de efectos colaterales inducidos por una disolución muy rápida de la placa, y el subsiguiente incremento de A $\beta$  soluble o la neuroinflamación debida a la interacción de los anticuerpos unidos a placa con la microglia.

Los resultados de la coloración en cerebro humano con enfermedad de Alzheimer se ilustran en las Figura 8 B, F-H.

Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de 0,7  $\mu$ g/ml en una sección transversal de neocorteza del paciente RZ55:

B) Los depósitos de parénquima de A $\beta$  (placas amiloides) se colorearon solo con 6G1 y 6E10, pero no con los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

F) Todos los anticuerpos selectivos para el globulómero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1) presentaron una coloración significativamente menor en comparación con los anticuerpos comercialmente disponibles 6E10 y 4G8.

H) Los depósitos vasculares de A $\beta$  (flechas) se colorearon solo con 6G1 y 6E10, pero no con anticuerpos selectivos para el globul mero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

Unión de diferentes anticuerpos con una concentración de entre 0,07 y 7,0  $\mu$ g/ml en sección transversal de neocorteza de ratones APP/LxPS1 transgénicos a los 11 meses de edad:

G) Los depósitos de A $\beta$  en parénquima (placas amiloides) presentaron una coloración significativamente menor y a menores concentraciones con 6G1, 6E10 y 4G8 que con los anticuerpos selectivos para el globul mero (es decir, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1).

Todos los depósitos amiloides se habían verificado con antelación con una coloración congof lica (Congo Red; véase la Fig. 8A).

La evaluación de los depósitos marrones de DAB demostró que los anticuerpos no selectivos A $\beta$  6G1 y 6E10 colorearon las placas y los vasos meníngeos, mientras que los anticuerpos selectivos del globul mero A $\beta$ (20-42) 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 y 10C1 no lo hicieron. Los anticuerpos disponibles comercialmente 6E10 y 4G8 presentaron una coloración mayor en comparación con los anticuerpos selectivos para globul mero, pero menor coloración que 6G1. Este descubrimiento confirma el patrón de coloración en ratones transgénicos APP, donde no hay unión a la fibrillas A $\beta$  u otras especies de A $\beta$  presentes en las estructuras amiloides in vivo, o donde dicha unión es marcadamente menor para los anticuerpos selectivos para el globul mero. Se supone que esta unión reducida a los

péptidos amiloides humanos reduce el peligro de efectos colaterales inducidos por la disolución muy rápida de las placas y el subsiguiente incremento de A $\beta$  soluble o la neuroinflamación debida a la interacción de los anticuerpos unidos a placa con la microglia.

**Ejemplo 10: Titulación de anticuerpo anti-A $\beta$  y perfil de sensibilidad de la transferencia puntual en plasma de ratones TG2576 aproximadamente un año después de la inmunización activa**

Aproximadamente un año después de la última inmunización (con globulómero A $\beta$ (20-42), globulómero A $\beta$ (12-42), monómero A $\beta$ (1-42) y vehículo) en ratones Tg 2576 (del ejemplo 9), se evaluaron los anticuerpos anti-A $\beta$  producidos y aun presentes en muestras de plasma. Para este objetivo, se realizaron diluciones en serie de las distintas formas de A $\beta$ (1-42) en el rango de concentración entre 100 pmol/ $\mu$ l y 0,01 pmol/ $\mu$ l en PBS + 0,2 mg/ml de BSA. De cada muestra, se aplicó 1  $\mu$ l sobre una membrana de nitrocelulosa. La detección se llevó a cabo con muestras de plasma de ratón apropiadas (con una dilución de 1:400). La coloración se llevó a cabo con IgG anti-ratón conjugada con fosfatasa alcalina, y con la adición del reactivo de coloración NBT/BCIP.

Referencias de A $\beta$  para transferencia puntual:

1. Globulómero A $\beta$ (1-42)

La preparación del globulómero A $\beta$ (1-42) se describe en el ejemplo 1a.

2. Monómero A $\beta$ (1-42) pretratado con HFIP en Pluronic F68

Se disolvieron 3 mg de A $\beta$ (1-42), (Bachem Inc.; N° de catálogo H-1368) en 0,5 ml de HFIP (suspensión de 6 mg/ml) en un tubo Eppendorff de 1,7 ml y

se agitó (mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C hasta obtener una solución límpida. La muestra se secó en un concentrador SpeedVac (1,5 horas) y se resuspendió en 13,2 µl de DMSO, se agitó durante 10 segundos, a lo que siguió una sonicación (20 segundos) y una agitación (por ejemplo en mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Se agregaron 6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 0,1% de Pluronic F68; pH 7,4, y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 3000 G. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se disolvió en 0,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM; NaCl 140 mM; 1% de Pluronic F68, pH 7,4. Se agregaron 3,4 ml de H<sub>2</sub>O y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, a lo que siguieron 20 minutos de centrifugación a 3000 G. Se almacenaron ocho alícuotas del sobrenadante de 0,5 ml cada una a -20°C para su uso posterior.

### 3. Globulómero Aβ(20-42)

La preparación del globulómero Aβ(20-42) se describe en el ejemplo 1c.

### 4. Globulómero Aβ(12-42)

La preparación del globulómero Aβ(1-42) se describe en el ejemplo 1d.

### 5. Monómero Aβ(1-40), HFIP pretratado, 5 mM en DMSO

Se resuspendió 1 mg de Aβ(1-40), (Bachem Inc, N° de cat. H-1194) en 0,25 ml de HFIP (suspensión de 4 mg/ml) en un tubo Eppendorff. Se agitó la titulación (por ejemplo en mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C para obtener una solución límpida, y luego se secó en un concentrador SpeedVac (durante 1,5 horas). La muestra se disolvió una vez más en 46 µl de DMSO (solución de 21,7 mg/ml = 5 mM), se agitó durante 10

segundos, y luego se sonicó durante 20 segundos. Después de agitar (por ejemplo, en un mezclador Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos, la muestra se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

#### 6. Monómero $\text{A}\beta(1-42)$ , $\text{NH}_4\text{OH}$ al 0,1%

Se disolvió 1 mg de  $\text{A}\beta(1-42)$  (Bachem Inc., N° de cat. H-1368) en 0,5 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 0,1% en  $\text{H}_2\text{O}$  (recién preparada) (= 2 mg/ml), e inmediatamente se agitó durante 30 segundos a temperatura ambiente para obtener una solución límpida. La muestra se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

#### 7. Fibrillas $\text{A}\beta(1-42)$

Se disolvió 1 mg de  $\text{A}\beta(1-42)$  (Bachem Inc. Catálogo N° H-1368) en 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso al 0,1% (tubo Eppendorff), y la muestra se agitó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se neutralizaron 100  $\mu\text{l}$  de esta solución recién preparada de  $\text{A}\beta(1-42)$  con 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM;  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4. El pH se ajustó a pH 7,4 con  $\text{HCl}$  al 1%. La muestra se incubó durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó (10 minutos a 10000 G). El sobrenadante se descartó y el precipitado de fibrillas se suspendió nuevamente con 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM;  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4, por vortexeado durante 1 minuto.

#### 8. sAPP $\alpha$

Proporcionado por Sigma (N° de catálogo S9564; 25  $\mu\text{g}$  en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM;  $\text{NaCl}$  140 mM; pH 7,4). El sAPP $\alpha$  se diluyó con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM,  $\text{NaCl}$  140 mM, pH 7,4, 0,2 mg/ml de BSA a razón de 0,1 mg/ml (= 1 pmol/ $\mu\text{l}$ ).

Materiales para transferencia puntual:

Referencias de  $\text{A}\beta$ :

Dilución en serie de antígenos A $\beta$  en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM,  
NaCl 140 mM, pH 7,4 + 0,2 mg/ml de BSA

- 1) 100 pmol/ $\mu$ l
- 2) 10 pmol/ $\mu$ l
- 3) 1 pmol/ $\mu$ l
- 4) 0,1 pmol/ $\mu$ l
- 5) 0,01 pmol/ $\mu$ l

Nitrocelulosa:

Medio de Transferencia Trans-Blot, Membrana de  
Nitrocelulosa Pura (0,45  $\mu$ m); BIO-RAD

Anti-AP de ratón:

AQ330A (Chemicon)

Reactivo de detección:

Tabletas NBT/BCIP (Roche)

Seroalbúmina Bovina, (BSA):

A-7888 (Fa. SIGMA)

Reactivo de bloqueo:

Leche descremada al 5% en TBS

Soluciones amortiguadoras:

TBS

25 mM de Tris/HCl – solución amortiguadora pH 7,5

+ NaCl 150 mM

TTBS

25 mM de Tris/HCl - solución amortiguadora pH 7,5

+ NaCl 150 mM

+ 0,05% de Tween 20

PBS + 0,2 mg/ml de BSA

Amortiguador de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 7,4

+ NaCl 140 mM

+ 0,2 mg/ml de BSA

**Solución de anticuerpo I:**

Plasma de ratones TG2576 sometidos a una inmunización activa, diluido 1/400 en 20 ml de leche descremada al 1% en TBS

**Solución de anticuerpo II:**

Dilución 1:5000

Anti-AP de ratón en leche descremada al 1% en TBS

**Procedimiento para transferencia puntual:**

1) Se transfiere 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de las distintas referencias de A $\beta$  (en sus 5 diluciones en serie) a la membrana de nitrocelulosa, con una distancia de aproximadamente 1 cm una de la otra.

2) Las transferencias de las referencias de A $\beta$  se dejan secar sobre la membrana de nitrocelulosa al aire durante al menos 10 minutos a TA (temperatura ambiente) (= transferencia puntual)

3) Bloqueo:

La transferencia puntual se incuba con 30 ml de leche descremada al 5% en TBS durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

4) Lavado:

Se descarta la solución de bloqueo y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

5) Solución de anticuerpo I:

Se descarta el amortiguador de lavado y se incuba la transferencia puntual con solución de anticuerpo I durante una noche a temperatura ambiente

6) Lavado:

Se descarta la solución de anticuerpo I y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

7) Solución de anticuerpo II:

Se descarta el amortiguador de lavado y se incuba la transferencia puntual con solución de anticuerpo II durante 1 hora a temperatura ambiente.

8) Lavado:

Se descarta la solución de anticuerpo II y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10



minutos a temperatura ambiente. Se descarta la solución de lavado y se incuba la transferencia puntual con 20 ml de TTBS con agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.

9) Revelado:

Se descarta la solución de lavado. Se disuelve 1 tableta de NBT/BCIP en 20 ml de H<sub>2</sub>O, y la transferencia puntual se incuba durante 5 minutos con esta solución. El revelado se detiene con un lavado intenso con H<sub>2</sub>O.

Los resultados se ilustran en la Figura 9.

Se probaron sueros de diferentes grupos de inmunización: a) globulómeros A $\beta$ (20-42); b) globulómeros A $\beta$ (12-42); c) monómero A $\beta$ (1-42), NH<sub>4</sub>OH al 0,1%; d) vehículo control contra distintas formas de A $\beta$  en una transferencia puntual para perfiles de anticuerpo diferentes.

1. Globulómero A $\beta$ (1-42)
2. Monómero A $\beta$ (1-42), pretratado con HFIP, en 0,1% de Pluronic F68
3. Globulómero A $\beta$ (20-42)
4. Globulómero A $\beta$ (12-42)
5. Monómero A $\beta$ (1-40), pretratado con HFIP, 5 mM en DMSO
6. Monómero A $\beta$ (1-42), disuelto en NH<sub>4</sub>OH al 0,1%
7. Preparación fibrilar A $\beta$ (1-42)
8. sAPP $\alpha$  (Sigma); (primera transferencia: 1 pmol)

En contraste con las inmunizaciones activas con vehículo como control o monómero A $\beta$ (1-42), la inmunización con globulómero A $\beta$ (20-42) o globulómero A $\beta$ (12-42), aun después de aproximadamente un año de la última inmunización, presenta una mayor titulación de anticuerpos. Estos anticuerpos

son selectivos para el globulómetro A $\beta$ (20-42) en el caso de la inmunización con el globulómetro A $\beta$ (20-42), o son selectivos para el globulómetro A $\beta$ (20-42) y para el globulómetro A $\beta$ (12-42) en el caso de la inmunización con el globulómetro A $\beta$ (12-42). Esto demuestra que el globulómetro truncado A $\beta$ (20-42) y el globulómetro A $\beta$ (12-42) representan un muy buen antígeno, y que los anticuerpos dirigidos contra ellos persisten largo tiempo in vivo (vale destacar que en algunas transferencias puntuales se observa una señal de coloración inespecífica que muy probablemente es una reacción de los anticuerpos murinos con la BSA que se usa en las diluciones en serie de los péptidos A $\beta$ ).

**Ejemplo 11: Niveles de epitopes de globulómetro A $\beta$ (20-42) en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer**

Extracto de cerebro SDS-DTT:

Muestras de cerebro con enfermedad de Alzheimer: RZ 16; RZ 52 y RZ 55 (obtenidas en Brain Net, Munich)

Muestra control: RZ 92 (obtenida en Brain Net, Munich)

Se disuelve una tableta de Inhibidor de Proteasa Completo (Roche, N° de cat. 1697 498) en 1 ml de H<sub>2</sub>O (= solución de inhibidor de proteasa). Se homogenizan 100 mg de muestra de cerebro con enfermedad de Alzheimer en 2,5 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 140 mM, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA (suplementada con 25  $\mu$ l de solución de inhibidor de proteasa) con 20 golpes en un mortero de vidrio. Se sonica la suspensión durante 30 segundos en hielo, luego se incuba a 37°C durante 16 horas. Se centrifuga la suspensión a 100000 G y 8°C durante una hora, luego se recolecta el sobrenadante. Se disuelve el residuo en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, y se homogeniza

con 10 golpes en un mortero de vidrio. Se agregan 75 µl de SDS al 10% y 125 µl de 0,16 mg/ml de DTT, y se agita durante 20 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifuga durante 10 minutos a 10000 G, y el sobrenadante se almacena durante una noche a -20°C. Antes de usarlo, el sobrenadante se descongela y se centrifuga otros 10 minutos a 10000 G. El sobrenadante (= extracto de cerebro SDS/DTT) se usa para un ELISA.

a) ELISA sándwich para el epitope de globulómero Aβ(20-42)

Lista de reactivos:

1. Inmuno-Placa F96 Cert. Maxisorp NUNC (N° de cat. 439454)
2. Anticuerpo de unión: 5F7, 7C6, 10F11
3. Agente de acoplamiento:  
carbonato ácido de sodio 100 mM, pH 9,6
4. Reactivo de bloqueo para ELISA (Roche Diagnostics GmbH N° de cat. 1112589)
5. Solución amortiguadora PBST:  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,4
6. Referencia de calibración de Aβ(20-42)
7. Anticuerpo primario:  
anti-Aβ pRAb BA199; purificado por afinidad (en sefarosa con globulómero Aβ(1-42)), solución de IgG en PBS; concentración: 0,22 mg/ml
8. Anticuerpo secundario:  
anti-conejo conjugado con POD; (Jackson ImmunoResearch, N° de cat. 111-036-045)
9. Revelado:

- TMB; (Roche Diagnostics GmbH N° de cat. 92817060), 42 mM en DMSO

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en H<sub>2</sub>O
- acetato de sodio 100 mM, pH 4,9
- Solución de terminación: ácido sulfúrico 2 M

Preparación de reactivo:

1. Anticuerpo de unión:

Los anticuerpos de unión individuales 5F7, 7C6 y 10F11 se diluyen hasta una concentración final de 0,7 µg/ml en amortiguador de acoplamiento.

2. Reactivo de bloqueo:

Para la preparación de la solución madre de bloqueo, se disuelve el reactivo de bloqueo en 100 ml de H<sub>2</sub>O y se lo almacena a -20°C en alícuotas de 10 ml cada una.

Se diluyen 3 ml de la solución madre de bloqueo con 27 ml de H<sub>2</sub>O para bloquear una placa de ELISA.

3. Referencia de calibración de Aβ(20-42) (CS1)

La preparación del globulómero Aβ(1-42) se describe en el ejemplo 1a.

Se determinó la concentración de proteínas de globulómero Aβ(20-42) (6,81 mg/ml) de acuerdo con Bradford (BioRad). Se diluyen 14,68 µl de globulómero Aβ(20-42) (6,81 mg/ml) en 10 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 140 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,4, 0,5% de BSA (= 10 µg/ml). Se diluyen adicionalmente 10 µl de la solución, a razón de 10 µg/ml, en 10 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

20 mM, NaCl 140 mM, 0,05% de Tween 20, pH 7,4, 0,5% de BSA (= 10 ng/ml = CS1)

Referencias de calibración para Aβ(20-42):

| Referencia de calibración | Volumen de referencia de calibración | de PBST + 0,5% de BSA | Concentración final Aβ(20-42) (pg/ml) |
|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| CS1.1                     | 1 ml de CS1                          | 0 ml                  | 10000                                 |
| CS1.2                     | 0,316 ml de CS1,1                    | 0,684 ml              | 3160                                  |
| CS1.3                     | 0,316 ml de CS1,2                    | 0,684 ml              | 1000                                  |
| CS1.4                     | 0,316 ml de CS1,3                    | 0,684 ml              | 316                                   |
| CS1.5                     | 0,316 ml de CS1,4                    | 0,684 ml              | 100                                   |
| CS1.6                     | 0,316 ml de CS1,5                    | 0,684 ml              | 31,6                                  |
| CS1.7                     | 0,316 ml de CS1,6                    | 0,684 ml              | 10                                    |
| CS1.8                     | 0,0                                  | 1,0 ml                | 0,0                                   |

Extractos de cerebro SDS/DTT:

Extractos de cerebro SDS/DTT = E#

(# representa las 4 muestras de cerebro humano (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92)

| muestra de extracción | volumen de muestra de extracción | PBST + 0,5% de BSA | factor de dilución |
|-----------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| E#.1                  | 1 ml de E#                       | 0,0 ml             | directo            |
| E#.2                  | 0,316 ml de E#,1                 | 0,684 ml           | 1:3,16             |
| E#.3                  | 0,316 ml de E#,1                 | 0,684 ml           | 1:10               |
| E#.4                  | 0,316 ml de E#,1                 | 0,684 ml           | 1:31,6             |

4. Anticuerpo primario:

Se diluye la solución madre de anti-A $\beta$  pRAb a 0,05  $\mu$ g/ml en PBST + 0,5% de BSA. La solución de anticuerpo se usa inmediatamente.

5. Anticuerpo secundario:

Se disuelve anti-conejo conjugado con POD liofilizado en 0,5 ml de H<sub>2</sub>O y se mezcla con 500  $\mu$ l de glicerol. Después, el concentrado de anticuerpo se almacena a -20°C en alícuotas de 100  $\mu$ l.

El concentrado se somete a una dilución de 1:10000 en amortiguador de PBST. La solución de anticuerpo se usa inmediatamente.

6. Solución de TMB:

Se mezclan 20 ml de acetato de sodio 100 mM, pH 4,9, con 200  $\mu$ l de solución de TMB y 29,5  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 3%. Esta solución se usa inmediatamente.

Placa de ELISA para A $\beta$ (20-42):

Los referencias de calibración (CS1.1-CS1.8) y los extractos de cerebro SDS/DTT de las 4 muestras humanas (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92 (= E1-E4 en sus 4 diluciones en serie E#.1-E#.4) se determinan por duplicado:

|   | 1         | 2         | 3    | 4    | 5    | 6    | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|-----------|------|------|------|------|---|---|---|----|----|----|
| A | CS1.<br>1 | CS1.<br>1 | E1.1 | E1.1 | E3.1 | E3.1 |   |   |   |    |    |    |
| B | CS1.<br>2 | CS1.<br>2 | E1.2 | E1.2 | E3.2 | E3.2 |   |   |   |    |    |    |

|   | 1         | 2         | 3    | 4    | 5    | 6    | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|-----------|------|------|------|------|---|---|---|----|----|----|
| C | CS1.<br>3 | CS1.<br>3 | E1.3 | E1.3 | E3.3 | E3.3 |   |   |   |    |    |    |
| D | CS1.<br>4 | CS1.<br>4 | E1.4 | E1.4 | E3.4 | E3.4 |   |   |   |    |    |    |
| E | CS1.<br>5 | CS1.<br>5 | E2.1 | E2.1 | E4.1 | E4.1 |   |   |   |    |    |    |
| F | CS1.<br>6 | CS1.<br>6 | E2.2 | E2.2 | E4.2 | E4.2 |   |   |   |    |    |    |
| G | CS1.<br>7 | CS1.<br>7 | E2.3 | E2.3 | E4.3 | E4.3 |   |   |   |    |    |    |
| H | CS1.<br>8 | CS1.<br>8 | E2.4 | E2.4 | E4.4 | E4.4 |   |   |   |    |    |    |

Este ELISA se lleva a cabo con cada uno de los anticuerpos monoclonales de unión 5F7, 7C6, 10F11.

Procedimiento

1. Se agregan 100 µl de solución de mAb por cavidad.  
Se incuba la placa de ELISA durante una noche a +6°C (heladera).
2. Se decanta la solución de anticuerpo y se lavan las cavidades tres veces, cada una con 250 µl de amortiguador de PBST.
3. Se agregan 250 µl/cavidad de solución de bloqueo.  
Se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.

4. Se decanta la solución de bloqueo y se lavan las cavidades tres veces, cada vez con 250  $\mu$ l de amortiguador de PBST.

5. Se agregan 100  $\mu$ l/cavidad de cada referencia de calibración y los extractos de cerebro SDS/DTT. Se Incuba la placa durante 2 horas a temperatura ambiente, luego durante una noche a 6°C.

6. Se decantan las referencias de calibración y las soluciones de extractos de cerebro SDS/DTT, y se lavan las cavidades tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de amortiguador de PBST.

7. Se agregan 200  $\mu$ l/cavidad de solución de anticuerpo primario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

8. Se decanta la solución de anticuerpo primario y se lavan las cavidades tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de amortiguador de PBST.

9. Se agregan 200  $\mu$ l/cavidad de solución de anticuerpo secundario y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.

10. Se decanta la solución de anticuerpo secundario y se lavan las cavidades tres veces, cada una con 250  $\mu$ l de amortiguador de PBST.

11. Se agregan 100  $\mu$ l/cavidad de solución de TMB.

12. Se monitorea el color de la placa durante el revelado (entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente) y se termina la



reacción agregando 50  $\mu$ l/cavidad de solución de terminación cuando se ha revelado el color apropiado.

13. Se mide la D.O. a 450 nm.
14. Se calculan los resultados usando la calibración.
15. Evaluación: Si las D.O. de las muestras están más allá del rango de calibración lineal, se las diluye nuevamente y se repite.

Los resultados se ilustran en la Figura 10.

Niveles cerebrales de epitopes de globulómeros A $\beta$ (20-42) en extractos de cerebro de pacientes con EA y sujetos controles

Se usó un ELISA sándwich para investigar el contenido de epitope de globulómero A $\beta$ (20-42) truncado en extractos de cerebro. Se usaron ELISA con anticuerpos respectivos contra el globulómero A $\beta$ (20-42) para la calibración.

La extracción de tejido cerebral con la enfermedad de Alzheimer demuestra que el contenido de epitope de globulómero A $\beta$ (20-42) se halla significativamente elevado comparado con un paciente control. Esto demuestra que efectivamente el epitope del globulómero A $\beta$ (20-42) es una especie de A $\beta$  de importancia en el cerebro con enfermedad de Alzheimer humana, y que no solamente es relevante para animales modelo con la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, los anticuerpos dirigidos contra el epitope del globulómero A $\beta$ (20-42) son altamente deseables para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

**Ejemplo 12: Revelado del anti-globulómero A $\beta$ (20-42) en líneas celulares de hibridomas**

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de éstas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando procedimientos de hibridomas que incluyen aquellos conocidos en la técnica y aquellos que se encuentran, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (dichas referencias se incorporan en la presente documentación a modo de referencia en su totalidad). El término "anticuerpo monoclonal", como se lo usa en la presente documentación, no se limita a los anticuerpos producidos con tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" hace referencia a un anticuerpo que deriva de un clon individual, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método con el que se lo produce.

El protocolo particular que se usa para producir los anticuerpos que se describen en la presente documentación es como se indica a continuación:

**Inmunización de ratones:** se inmunizaron ratones Balb/c y A/J (entre 6 y 8 semanas de edad) por vía subcutánea con 50 µg de antígeno en CFA. Los animales se estimularon cada tres semanas con 50 µg de antígeno en Immuneasy™ (Qiagen) con un total de tres estímulos. Cuatro días antes de la fusión, los ratones se estimularon con 10 µg de antígeno en forma intravenosa.

**Fusión celular y análisis de hibridomas:** se fusionaron células de bazo de los animales inmunizados con células de mieloma SP2/0-Ag14 con una

relación de 5:1 usando técnicas convencionales. Entre siete y diez días después de la fusión, cuando se observaron colonias macroscópicas, se evaluaron los SN con un ELISA para anticuerpos contra el globulómero A $\beta$ (20-42). Las células de las cavidades positivas en el ELISA se escalaron y se clonaron con una dilución limitante.

Determinación del isotipo de anticuerpo: el isotipo del anticuerpo monoclonal anti-globulómero A $\beta$ (20-42) se determinó usando el conjunto de elementos para isotipificación Zymed EIA.

Escalado y purificación de anticuerpos monoclonales: Se expandieron los hibridomas en medio con 5% de suero fetal bovino con baja IgG (Hyclone). El sobrenadante se cosechó y se concentró. El mAb se purificó usando cromatografía en Proteína A y se dializó en PBS.

Titulaciones de suero: se inmunizaron diez ratones con el globulómero A $\beta$ (20-42). Todos los ratones se seroconvirtieron con títulos de ELISA (1/2 de DO Max a 450 nm) de entre 1:5000 y 1:10000.

\*\*\*\*\*

#### DESIGNACIONES DE HIBRIDOMAS QUE PRODUCEN ANTICUERPOS MONOCLONALES

Designaciones internas de Abbott Laboratories que se usan para los registros.

##### Líneas Celulares Registradas:

- 1) ML13-7C6.1D4.4A9.5G8 (también denominada en la presente documentación "7C6")

- 2) ML15-5F7.5B10 (también denominada en la presente documentación "5F7")
- 3) ML15-10F11.3D9 (también denominada en la presente documentación "10F11")
- 4) ML15-4B7.3A6 (también denominada en la presente documentación "4B7")
- 5) ML15-2F2.3E12 (también denominada en la presente documentación "2F2")
- 6) ML15-6A2.4B10 (también denominada en la presente documentación "6A2")
- 7) ML13-4D10.3F3 (también denominada en la presente documentación "4D10")
- 8) ML15-7E5.5E12 (también denominada en la presente documentación "7E5")
- 9) ML15-10C1.5C6.3H4 (también denominada en la presente documentación "10C1")
- 10) ML15-3B10.2D5.3F1 (también denominada en la presente documentación "3B10")

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abbott GmbH & Co.KG  
Abbott Laboratories

<120> ANTICUERPOS ANTI-GLOBULÓMERO AB, PORCIONES DE UNIÓN A ANTÍGENO DE ÉSTOS, HIBRIDOMAS CORRESPONDIENTES, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HUÉSPED, MÉTODOS PARA PRODUCIR DICHOS ANTICUERPOS, COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN DICHOS ANTICUERPOS, USOS DE DICHOS ANTICUERPOS, Y MÉTODOS PARA USAR DICHOS ANTICUERPOS

<130> M/46385

<150> US 60/740,866

<151> 2005-11-28

<150> US 60/779,171

<151> 2006-03-03

<150> US 60/787,361

<151> 2006-03-30

<150> US 60/842,400

<151> 2006-09-05

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML15-5F7

&lt;400&gt; 1

caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcact accttctata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300

tcagctcggg cggcctgggt tgccttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VL ML15-5F7

&lt;400&gt; 2

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcct 300

cccacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 3  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VH ML15-5F7

<400> 3

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Lys Ser Ala Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 4  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> VL ML15-5F7

<400> 4

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95



Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 5  
<211> 360  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VH ML15-10F11

<400> 5  
caggccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tcttgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcagagg 120  
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat atttatectt acaatgatgg tactaagtac 180  
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagtatat 240  
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctacagtct attactgtac agtagagggt 300  
gctacctggg acgggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctectca 360

<210> 6  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VL ML15-10F11  
  
<400> 6  
gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca atcagcctct 60  
  
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaaag gaaaaaccta tttgaattgg 120  
  
ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180  
  
tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240  
  
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaaggtag acattttcct 300  
  
cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 7  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> VH ML15-10F11

<400> 7  
  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
  
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
  
Val Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Val Glu Gly Ala Thr Trp Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML15-10F11

<400> 8

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

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser



tctctgtcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc tgtcttgggt tgcgcagact 120  
ccagcgaaga ggctagagtg ggtcgcgctc attcataata gaggtactat cttctatcta 180  
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacac cctgtacctg 240  
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatatatt actgtacaag aggccggagt 300  
aactcctatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctgc 354

<210> 10  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VL ML13-7C6

<400> 10  
gatgttttgg tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ggcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttggc gatctactca gacccttgta catcgtaatg gagacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag tccctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacagggt cagcggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300  
tacacgttcg gaggggggac caagctgyaa ataaaacgg 339

<210> 11  
<211> 118  
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML13-7C6

<400> 11

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Ile His Asn Arg Gly Thr Ile Phe Tyr Leu Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

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

Arg Gly Arg Ser Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML13-7C6

<400> 12

Asp Val Leu Val Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly  
 1 5 10 15

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 13  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VH ML15-4B7

<400> 13  
gagggtgaagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgacgc ctggaggctc ccggaaactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tgggtgtgggt tcgacaggct 120  
ccagggggagg ggctggagtg ggttgcatat attagtagtg gcagtcgtac catccactat 180  
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240  
ctgcaaataa gcagtcctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300  
ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcacagtctc ctca 354

<210> 14  
<211> 342  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VL ML15-4B7



<400> 14  
gacattgtga tgtcacagtc tccatctctcc ctactgtgtg cagttggaga gaaggttact 60  
  
atgagctgca ggtccagtca gagccttttc tataggagca atcaaaagaa cttcttggcc 120  
  
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 180  
  
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
  
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300  
  
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 15  
<211> 118  
<212> FRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> VH ML15-4B7

<400> 15

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val

```

50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65              70              75              80

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

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100            105            110

Ile Leu Thr Val Ser Ser
115

<210>  16
<211>  114
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  VL ML15-4B7

<400>  16

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg
20            25            30

```

Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

- <210> 17
- <211> 360
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> VH ML15-2F2

<400> 17  
caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60  
tcttgaagg cttctggcta caccttcact accttctata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180  
aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300  
tcagctcggg cggcctgggt tgcctactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 18  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> VL ML15-2F2

<400> 18  
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60  
atctcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtcctcaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggtgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300  
cccacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 19  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

&lt;223&gt; VH ML15-2F2

&lt;400&gt; 19

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Lys Ser Ala Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

&lt;210&gt; 20

<211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML15-2F2

<400> 20

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 21  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VH ML15-6A2

<400> 21  
 cagggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60  
 tccctgcaagg cttctggcta caccctcact accttctata tacactgggt gaggcagagg 120  
 cctggacagg gccctgagtg gattggaatg attggctctg gaagtggtaa tacttactac 180  
 aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300  
 tcacatcggg cggcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctctgca 360

<210> 22  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML15-6A2

<400> 22  
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcggttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tttgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt agatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggttc acatgttctt 300  
 cccacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 23  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VH ML15-6A2

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe  
 20 25 30

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

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe  
 50 55 60



Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Lys Ser His Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 24  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML15-6A2

<400> 24

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Phe Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 25  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VH ML13-4D10

<400> 25  
 cagggtgcagc tgaagcagtc aggacctagc ctaatacagc cctcacagag cctgtccata 60  
 acctgcacag tctctgggtt ctcattaact agctatgggtg tacactgggt tcgccagtct 120  
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagag gtggaaggat agactataat 180  
 gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttc 240

aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccag aaactccgat 300

gtctggggca cagggaccac ggtcaaccgc tectca 336

<210> 26

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VL ML13-4D10

<400> 26

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca agtcaagta gagcctotta gatattgatg gaaagacata ttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggcctgagga ttctggagtt cattattgct ggcaaggta acattttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML13-4D10

<400> 27

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Ser Leu Ile Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VL ML13-4D10

&lt;400&gt; 28

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile  
                   20                    25                    30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                   85                    90                    95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110

Arg

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML15-7E5

<400> 29

```

gaggtgaagc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgagc ctggaggctc ccggaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tggtaggggt tcgacaggt      120
ccaggggagg ggctggagtg ggttgcatat attagtagtg gcagtcgtac catccactat      180
gcagacacag tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc      240
ctgcaaatga gcagtcctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta      300
ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccatc tcacagtctc ctca      354

```

<210> 30

<211> 342

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> VL ML15-7E5

<400> 30

```

gacattgtga tgtcacagtc tccatctctc ctactgtgt cagttggaga gaaggttact      60
atgagctgca ggtccagtca ggccttttc tataggagca atcaaaagaa cttcttggcc      120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga ttactgggc atccactagg      180
gaatctgggg tccctgateg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat      300

```

ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg

342

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML15-7E5

<400> 31

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ile Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 32  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VL ML15-7E5

<400> 32

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg  
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80



Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

Lys Arg

- <210> 33
- <211> 354
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> VH ML15-10C1

<400> 33  
gagggtgaagc tgggtggagtc tggggggaggt ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60  
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tgggtgtgggt tcgacaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcatac attaatagtg gcagtgggtac catccactat 180  
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240  
ctgcaaataa gcagtctaag gctcgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300  
ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcaactgtctc ctca 354

- <210> 34

<211> 342  
<212> ADN  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> VL ML15-10C1  
  
<400> 34  
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc cttagctgtgt cagttggaga gaagggtact 60  
  
atgagctgca agtccagtca gagccttttc tatagtcgca atcaaaagaa cttcttggcc 120  
  
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactggg 180  
  
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
  
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300  
  
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 35  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> VH ML15-10C1

<400> 35  
  
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
  
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ile Leu Thr Val Ser Ser  
115

- <210> 36
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> VL ML15-10C1

- <400> 36

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly

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

Lys Arg

<210> 37  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

<223> VH ML15-3B10

<400> 37

caggtecagc tgcagcagtc tggacotgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
tcttcaagg cttctggata cacattcact gactatgta tacactgggt gaagcagaag 120  
cctgggcagg gccitgagtg gattggatct attaatcctt acaatgatgg tactcagtac 180  
aatgagaact tcaaaggcaa ggccacaactg acctcagaca aatctctccag cacagtctac 240  
atggagctca gcagtctgac ctctgaggac tctacagtct actactgtac agtagagggc 300  
ggtaacctgg acgggtatctt cgatgcctgg ggcacagggc ccacgggtcac cgtctctca 360

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH ML15-3B10

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Val Glu Gly Gly Thr Trp Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 39

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ig gamma-1 constant region

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320



Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 40  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Ig gamma-1 constant region mutant

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                             245                            250                            255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                             260                            265                            270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                             275                            280                            285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                             290                            295                            300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
                             305                            310                            315                            320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                             325                            330

<210> 41  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Ig Kappa constant region

<400> 41

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
                             1                            5                            10                            15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
                   20                          25                          30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
           35                          40                          45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
       50                          55                          60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
   65                          70                          75                          80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
                           85                          90                          95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
           100                          105

<210> 42  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> región constante de Ig Lambda

<400> 42

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
   1                          5                          10                          15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
                   20                          25                          30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
                   35                          40                          45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
                   50                          55                          60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
                   65                          70                          75                          80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
                                   85                          90                          95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
                   100                          105

**REIVINDICACIONES:**

1. Anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un globulómero A $\beta$ (20-42) que es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (1-42).
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 1000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).
6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (1-42).
7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad mayor.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad mayor.
10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o con una afinidad mayor.
11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-10}$  M o con una afinidad mayor.
12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-11}$  M o con una afinidad mayor.
13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un globulómero A $\beta$ (12-42).
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).
15. El anticuerpo de la reivindicación 13 ó 14, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).

16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 1000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).
17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).
18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (12-42).
19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (20-42) con una  $K_D$  en el rango de entre  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M, y se une al globulómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (1-42).
20. El anticuerpo de la reivindicación 19, donde el anticuerpo se une al globulómero A $\beta$ (12-42) con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M o con una afinidad menor, donde la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (20-42) es mayor que la afinidad de unión por el globulómero A $\beta$ (12-42).
21. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10 veces mayor que por un monómero A $\beta$ (1-42).



22. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100 veces mayor que por el monómero A $\beta$ (1-42).
23. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 1000 veces mayor que por el monómero A $\beta$ (1-42).
24. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10000 veces mayor que por el monómero A $\beta$ (1-42).
25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que por el monómero A $\beta$ (1-42).
26. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, donde el anticuerpo se une al monómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor.
27. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde el anticuerpo se une al monómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor.
28. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, donde el anticuerpo se une al monómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor.
29. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, donde el anticuerpo se une al monómero A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.

30. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por un monómero A $\beta$ (1-40).
31. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el monómero A $\beta$ (1-40).
32. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 1000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el monómero A $\beta$ (1-40).
33. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el monómero A $\beta$ (1-40).
34. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por el monómero A $\beta$ (1-40).
35. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, donde el anticuerpo se une al monómero A $\beta$ (1-40) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor.

36. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, donde el anticuerpo se une al monómero  $A\beta(1-40)$  con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor.
37. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, donde el anticuerpo se une al monómero  $A\beta(1-40)$  con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor.
38. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, donde el anticuerpo se une al monómero  $A\beta(1-40)$  con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.
39. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero  $A\beta(20-42)$  es al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas  $A\beta(1-42)$ .
40. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero  $A\beta(20-42)$  es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas  $A\beta(1-42)$ .
41. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero  $A\beta(20-42)$  es al menos 1000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas  $A\beta(1-42)$ .
42. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero  $A\beta(20-42)$  es al menos 10000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas  $A\beta(1-42)$ .

43. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-42).
44. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor.
45. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor.
46. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor.
47. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-42) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.
48. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 47, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-40).
49. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-40).

50. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 1000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-40).
51. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 10000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-40).
52. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, donde la afinidad de unión del anticuerpo por el globulómero A $\beta$ (20-42) es al menos 100000 veces mayor que la afinidad de unión del anticuerpo por las fibrillas A $\beta$ (1-40).
53. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-40) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o con una afinidad menor.
54. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-40) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o con una afinidad menor.
55. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 54, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-40) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o con una afinidad menor.
56. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, donde el anticuerpo se une a las fibrillas A $\beta$ (1-40) con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-5}$  M o con una afinidad menor.

57. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 56, donde el anticuerpo es un anticuerpo aislado.
58. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 57, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
59. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 58, donde el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
60. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59, donde el anticuerpo es humano o está humanizado.
61. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 60, donde dicho anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal 5F7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241, el anticuerpo monoclonal 10F11, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239, el anticuerpo monoclonal 7C6, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240, el anticuerpo monoclonal 4B7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242, el anticuerpo monoclonal 2F2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408, el anticuerpo monoclonal 6A2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409, el anticuerpo monoclonal 4D10, que se obtiene de un hibridoma al

que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405, el anticuerpo monoclonal 7E5, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809, el anticuerpo monoclonal 10C1, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810, y el anticuerpo monoclonal 3B10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

62. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61, donde el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR3 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR3 de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal 5F7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241, el anticuerpo monoclonal 10F11, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239, el anticuerpo monoclonal 7C6, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240, el anticuerpo monoclonal 4B7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242, el anticuerpo monoclonal 2F2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408, el anticuerpo monoclonal 6A2, que se obtiene

de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409, el anticuerpo monoclonal 4D10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405, el anticuerpo monoclonal 7E5, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809, el anticuerpo monoclonal 10C1, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810, y el anticuerpo monoclonal 3B10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

63. El anticuerpo de la reivindicación 62, donde el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR2 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR2 de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal 5F7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241, el anticuerpo monoclonal 10F11, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239, el anticuerpo monoclonal 7C6, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240, el anticuerpo monoclonal 4B7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242, el anticuerpo monoclonal 2F2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito



de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408, el anticuerpo monoclonal 6A2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409, el anticuerpo monoclonal 4D10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405, el anticuerpo monoclonal 7E5, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809, el anticuerpo monoclonal 10C1, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810, y el anticuerpo monoclonal 3B10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

64. El anticuerpo de la reivindicación 62 ó 63, donde el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada CDR1 y/o la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana CDR1 de un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal 5F7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241, el anticuerpo monoclonal 10F11, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239, el anticuerpo monoclonal 7C6, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240, el anticuerpo monoclonal 4B7, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección

Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242, el anticuerpo monoclonal 2F2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408, el anticuerpo monoclonal 6A2, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409, el anticuerpo monoclonal 4D10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405, el anticuerpo monoclonal 7E5, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809, el anticuerpo monoclonal 10C1, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810, y el anticuerpo monoclonal 3B10, que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

65. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 3, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 4, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 97-109 de SEQ ID N° 7, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 8, los

residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 8, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 98-107 de SEQ ID N° 11, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 12, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 15, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 16, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 19, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 20, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 99-109 de SEQ ID N° 23, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 24, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 50-65 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 98-101 de SEQ ID N° 27, los residuos de aminoácidos 24-39 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 55-61 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 94-102 de SEQ ID N° 28, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 31, los residuos de

aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 31, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 32, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 99-107 de SEQ ID N° 35, los residuos de aminoácidos 24-40 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 56-62 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 95-103 de SEQ ID N° 36, los residuos de aminoácidos 31-35 de SEQ ID N° 38, los residuos de aminoácidos 50-66 de SEQ ID N° 38, y los residuos de aminoácidos 98-109 de SEQ ID N° 38.

- 66. El anticuerpo de la reivindicación 65, donde el anticuerpo comprende al menos 3 CDR.
- 67. El anticuerpo de la reivindicación 66, donde las al menos 3 CDR se seleccionan entre un conjunto de CDR de dominios variables que consiste en:

|                           |                                                    |
|---------------------------|----------------------------------------------------|
| Conjunto de CDR de VH 5F7 |                                                    |
| VH 5F7 CDR-H1             | TFYIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 3            |
| VH 5F7 CDR-H2             | MIGPGSGNTYYNEMFKD<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 3 |
| VH 5F7 CDR-H3             | AKSARAAWFAY<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 3      |

|                                        |                                                    |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 5F7</b>   |                                                    |
| VL 5F7 CDR-L1                          | RSSQSVVQSNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 4 |
| VL 5F7 CDR-L2                          | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 4          |
| VL 5F7 CDR-L3                          | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 4       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 10F11</b> |                                                    |
| VH 10F11 CDR-H1                        | SYVMH<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 7             |
| VH 10F11 CDR-H2                        | YIYPYNDGTYNEKFKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 7  |
| VH 10F11 CDR-H3                        | TVEGATWDGYFDV<br>residuos 97-109 de SEQ ID N° 7    |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 10F11</b> |                                                    |
| VL 10F11 CDR-L1                        | KSSQSLLYSKGKTYLN:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 8 |
| VL 10F11 CDR-L2                        | LVSKLDS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 8          |
| VL 10F11 CDR-L3                        | VQGTHFPHT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 8       |

|                                      |                                                     |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 7C6</b> |                                                     |
| VH 7C6 CDR-H1                        | SYAMS:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 11            |
| VH 7C6 CDR-H2                        | SIHNRGTIFYLDSVKG<br>residuos 50-65 de SEQ ID N° 11  |
| VH 7C6 CDR-H3                        | GRSNSYAMDY<br>residuos 98-107 de SEQ ID N° 11       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 7C6</b> |                                                     |
| VL 7C6 CDR-L1                        | RSTQTLVHRNGDTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 12 |
| VL 7C6 CDR-L2                        | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 12          |
| VL 7C6 CDR-L3                        | FQGSHVPYT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 12       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 4B7</b> |                                                     |
| VH 4B7 CDR-H1                        | DYEMV<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 15             |
| VH 4B7 CDR-H2                        | YISSGSRTIHYADTVKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 15 |
| VH 4B7 CDR-H3                        | TLLRLHFDY<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 15        |

|                                      |                                                      |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 4B7</b> |                                                      |
| VL 4B7 CDR-L1                        | RSSQSLFYRSNQKNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 16 |
| VL 4B7 CDR-L2                        | WASTRES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 16           |
| VL 4B7 CDR-L3                        | QQYYSYPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 16        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 2F2</b> |                                                      |
| VH 2F2 CDR-H1                        | TFYIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 19             |
| VH 2F2 CDR-H2                        | MIGPGSGNTYYNEMFKD<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 19  |
| VH 2F2 CDR-H3                        | AKSARAAWFAY<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 19       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 2F2</b> |                                                      |
| VL 2F2 CDR-L1                        | RSSQSVVQSNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 20  |
| VL 2F2 CDR-L2                        | KVSNRFS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 20           |
| VL 2F2 CDR-L3                        | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 20        |

|                                       |                                                      |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 6A2</b>  |                                                      |
| VH 6A2 CDR-H1                         | TFYIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 23             |
| VH 6A2 CDR-H2                         | MIGPGSGNTYYNEMFKD<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 23  |
| VH 6A2 CDR-H3                         | AKSHRAAWFAY<br>residuos 99-109 de SEQ ID N° 23       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 6A2</b>  |                                                      |
| VL 6A2 CDR-L1                         | RSSQSVVQSNNGNTYLE:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 24 |
| VL 6A2 CDR-L2                         | KVSNRFF:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 24           |
| VL 6A2 CDR-L3                         | FQGSHVPPT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 24        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 4D10</b> |                                                      |
| VH 4D10 CDR-H1                        | SYGVH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 27             |
| VH 4D10 CDR-H2                        | VIWRGGRIDYNAAFMS<br>residuos 50-65 de SEQ ID N° 27   |
| VH 4D10 CDR-H3                        | NSDV:<br>residuos 98-101 de SEQ ID N° 27             |



|                                       |                                                      |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 4D10</b> |                                                      |
| VL 4D10 CDR-L1                        | KSSQSLLDIDGKTYLN:<br>residuos 24-39 de SEQ ID N° 28  |
| VL 4D10 CDR-L2                        | LVSKLDS:<br>residuos 55-61 de SEQ ID N° 28           |
| VL 4D10 CDR-L3                        | WQGTHFPYT:<br>residuos 94-102 de SEQ ID N° 28        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 7E5</b>  |                                                      |
| VH 7E5 CDR-H1                         | DYEMV:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 31             |
| VH 7E5 CDR-H2                         | YISSGSRTIHYADTVKG:<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 31 |
| VH 7E5 CDR-H3                         | TLLRLHFEDY:<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 31       |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 7E5</b>  |                                                      |
| VL 7E5 CDR-L1                         | RSSQSLFYRSNQNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 32  |
| VL 7E5 CDR-L2                         | WASTRES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 32           |
| VL 7E5 CDR-L3                         | QQYYSPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 32         |

|                                        |                                                      |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 10C1:</b> |                                                      |
| VH 10C1 CDR-H1                         | DYEMV<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 35              |
| VH 10C1 CDR-H2                         | YINSGSGTIHYADTVKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 35  |
| VH 10C1 CDR-H3                         | TLLRLHFDY<br>residuos 99-107 de SEQ ID N° 35         |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VL 10C1</b>  |                                                      |
| VL 10C1 CDR-L1                         | KSSQSLFYSRNQKNFLA:<br>residuos 24-40 de SEQ ID N° 36 |
| VL 10C1 CDR-L2                         | WASTGES:<br>residuos 56-62 de SEQ ID N° 36           |
| VL 10C1 CDR-L3                         | QQYFSYPWT:<br>residuos 95-103 de SEQ ID N° 36        |
| <b>Conjunto de CDR<br/>de VH 3B10:</b> |                                                      |
| VH 3B10 CDR-H1                         | DYVIH:<br>residuos 31-35 de SEQ ID N° 38             |
| VH 3B10 CDR-H2                         | YINPYNDGTQYNEKFKG<br>residuos 50-66 de SEQ ID N° 38  |
| VH 3B10 CDR-H3                         | VEGGTWDGYFDV<br>residuos 98-109 de SEQ ID N° 38      |

68. El anticuerpo de la reivindicación 67, donde el anticuerpo comprende al menos 2 conjuntos de CDR de dominios variables.
69. El anticuerpo de la reivindicación 68, donde los al menos 2 conjuntos de CDR de dominios variables se seleccionan del grupo que consiste en:  
el conjunto de CDR de VH 5F7 y el conjunto de CDR de VL 5F7; el conjunto de CDR de VH 10F11 y el conjunto de CDR de VL 10F11; el conjunto de CDR de VH 7C6 y el conjunto de CDR de VL 7C6; el conjunto de CDR de VH 4B7 y el conjunto de CDR de VL 4B7; el conjunto de CDR de VH 2F2 y el conjunto de CDR de VL 2F2; el conjunto de CDR de VH 6A2 y el conjunto de CDR de VL 6A2; el conjunto de CDR de VH 4D10 y el conjunto de CDR de VL 4D10; el conjunto de CDR de VH 7E5 y el conjunto de CDR de VL 7E5; y el conjunto de CDR de VH 10C1 y el conjunto de CDR de VL 10C1.
70. Anticuerpo que comprende al menos un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36 y SEQ ID N° 38.
71. El anticuerpo de la reivindicación 70, que comprende dos dominios variables, donde dichos dos dominios variables tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 y SEQ ID N° 8 y SEQ ID N° 11 y SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 15 y SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 19 y SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 23 y

SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 27 y SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 31 y SEQ ID N° 32, y SEQ ID N° 35 y SEQ ID N° 36.

72. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 71, donde el anticuerpo comprende una región constante.
73. El anticuerpo de la reivindicación 72, donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las regiones constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD e IgE.
74. El anticuerpo de la reivindicación 73, donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1.
75. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 72 a 74, donde la región constante es una región constante humana.
76. El anticuerpo de la reivindicación 72, donde la región constante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 39-42.
77. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 76, donde el anticuerpo posee un patrón de glicosilación humano.
78. Anticuerpo monoclonal (5F7) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7241.
79. Anticuerpo monoclonal (10F11) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7239.

80. Anticuerpo monoclonal (7C6) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7240.
81. Anticuerpo monoclonal (4B7) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7242.
82. Anticuerpo monoclonal (2F2) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7408.
83. Anticuerpo monoclonal (6A2) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7409.
84. Anticuerpo monoclonal (4D10) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7405.
85. Anticuerpo monoclonal (7E5) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7809.
86. Anticuerpo monoclonal (10C1) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7810.
87. Anticuerpo monoclonal (3B10) que se obtiene de un hibridoma al que se le asignó el número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo PTA-7851.

88. Porción de unión a antígeno de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 87.
89. La porción de unión a antígeno de la reivindicación 88, donde la porción es un fragmento Fab, es un fragmento  $F(ab')_2$  o es un fragmento de una cadena sencilla Fv del anticuerpo.
90. Híbrido al que se le asignó un número de depósito de la Colección Americana de Tipos de Cultivo seleccionado del grupo que consiste en PTA-7241, PTA-7239, PTA-7240, PTA-7242, PTA-7408, PTA-7409, PTA-7405, PTA-7809, PTA-7810 y PTA-7851.
91. Ácido nucleico aislado que codifica una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-89.
92. Vector que comprende un ácido nucleico aislado de la reivindicación 91
93. El vector de la reivindicación 92, donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV y pBJ.
94. Célula hospedera que comprende un vector de la reivindicación 92 ó 93.
95. La célula hospedera de la reivindicación 94, donde dicha célula hospedera es una célula procariota.
96. La célula hospedera de la reivindicación 95, donde dicha célula procariota es *E. coli*.
97. La célula hospedera de la reivindicación 94, donde dicha célula hospedera es una célula eucariota.
98. La célula hospedera de la reivindicación 97, donde dicha célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en células protistas, células animales, células vegetales y células fúngicas.

99. La célula hospedera de la reivindicación 98, donde dicha célula animal se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de ave y una célula de insecto.
100. La célula hospedera de la reivindicación 97, donde dicha célula eucariota es una célula CHO, una célula COS o una célula de levadura.
101. La célula hospedera de la reivindicación 100, donde dicha célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
102. La célula hospedera de la reivindicación 99, donde dicha célula de insecto es una célula de insecto Sf9.
103. Método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar una célula hospedera de cualquiera de las reivindicaciones 94 a 102 o un hibridoma de la reivindicación 90 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir el anticuerpo.
104. Anticuerpo que se obtiene con el método de la reivindicación 103.
105. Composición que comprende un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89.
106. La composición de la reivindicación 105, donde la composición es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo aceptable para el uso farmacéutico.
107. Uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89 para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir una amiloidosis.
108. El uso de la reivindicación 107, donde la composición farmacéutica es para la inmunización pasiva.

109. Uso de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89 para preparar una composición para diagnosticar una amiloidosis.
110. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 107 a 109, donde la amiloidosis es la enfermedad de Alzheimer.
111. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 107 a 109, donde la amiloidosis es la amiloidosis del síndrome de Down.
112. Método para tratar o prevenir una amiloidosis en un sujeto que lo necesita, que comprende administrarle un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89 al sujeto.
113. El método de la reivindicación 112, donde la administración del anticuerpo o la porción de unión a antígeno es para la inmunización pasiva.
114. Método para diagnosticar una amiloidosis, que comprende proporcionar una muestra del sujeto sospechoso de padecer una amiloidosis, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 89, y detectar la formación de un complejo que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno con un antígeno, donde la presencia del complejo indica una amiloidosis en el sujeto.
115. El método de cualquiera de las reivindicaciones 112 a 114, donde la amiloidosis es la enfermedad de Alzheimer.
116. El método de cualquiera de las reivindicaciones 112 a 114, donde la amiloidosis es la amiloidosis del síndrome de Down.



FIG. 1

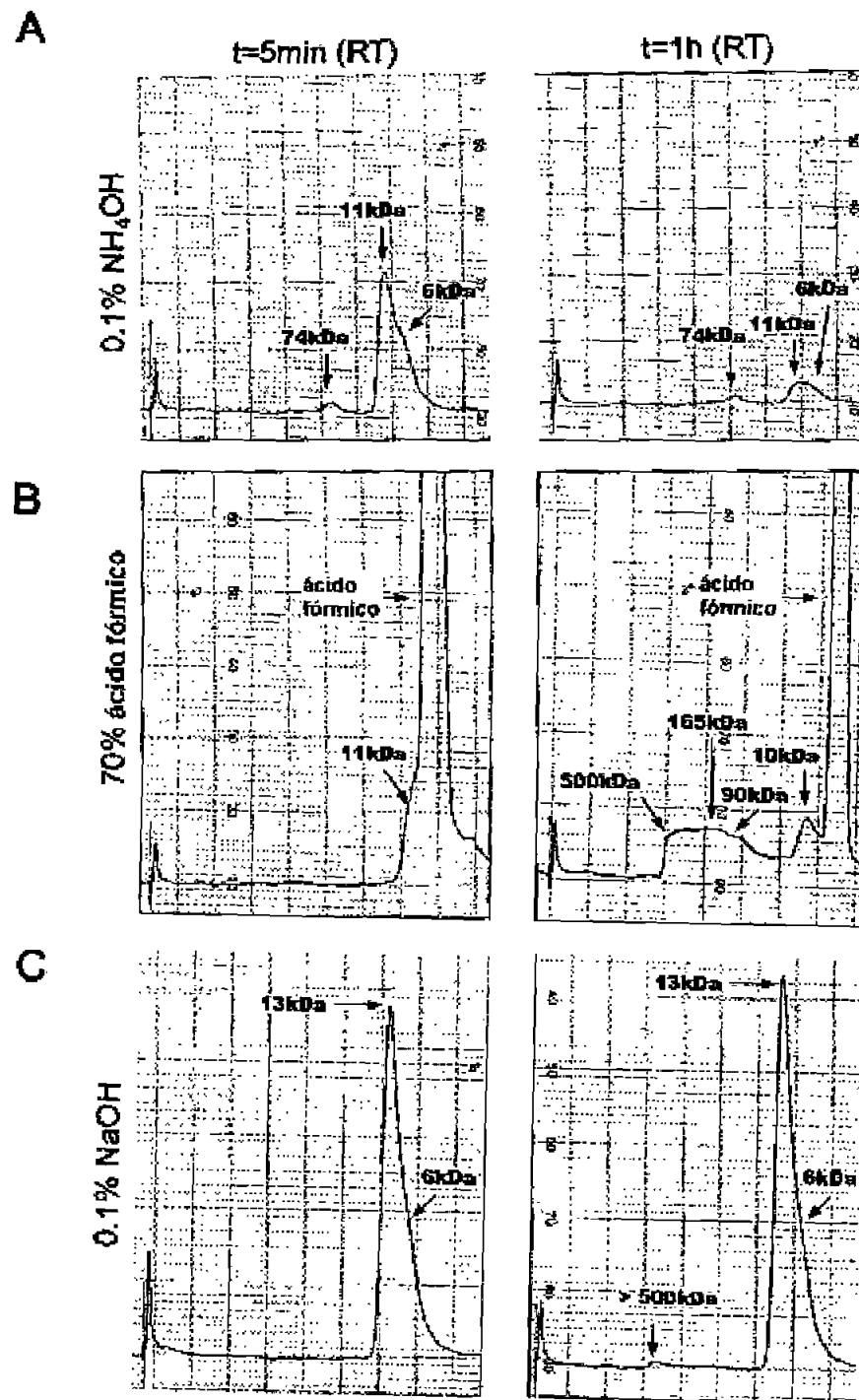


FIG. 1

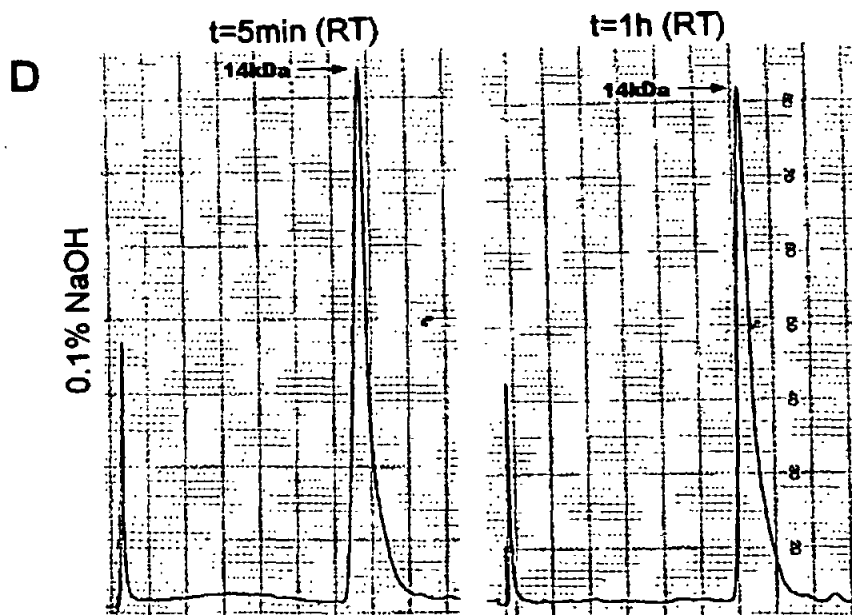




FIG. 3

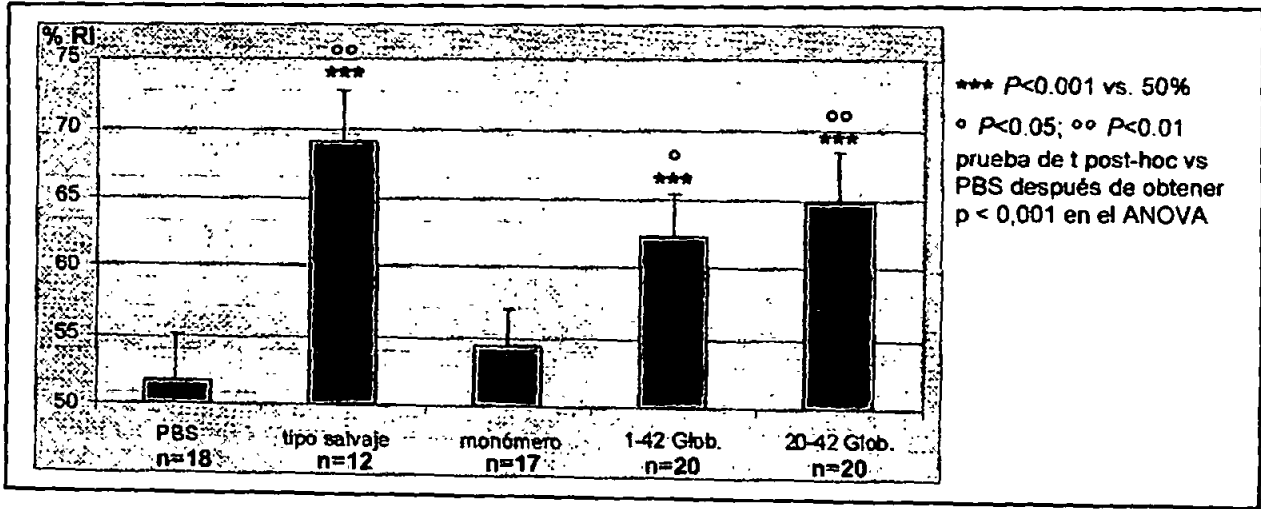


FIG. 4

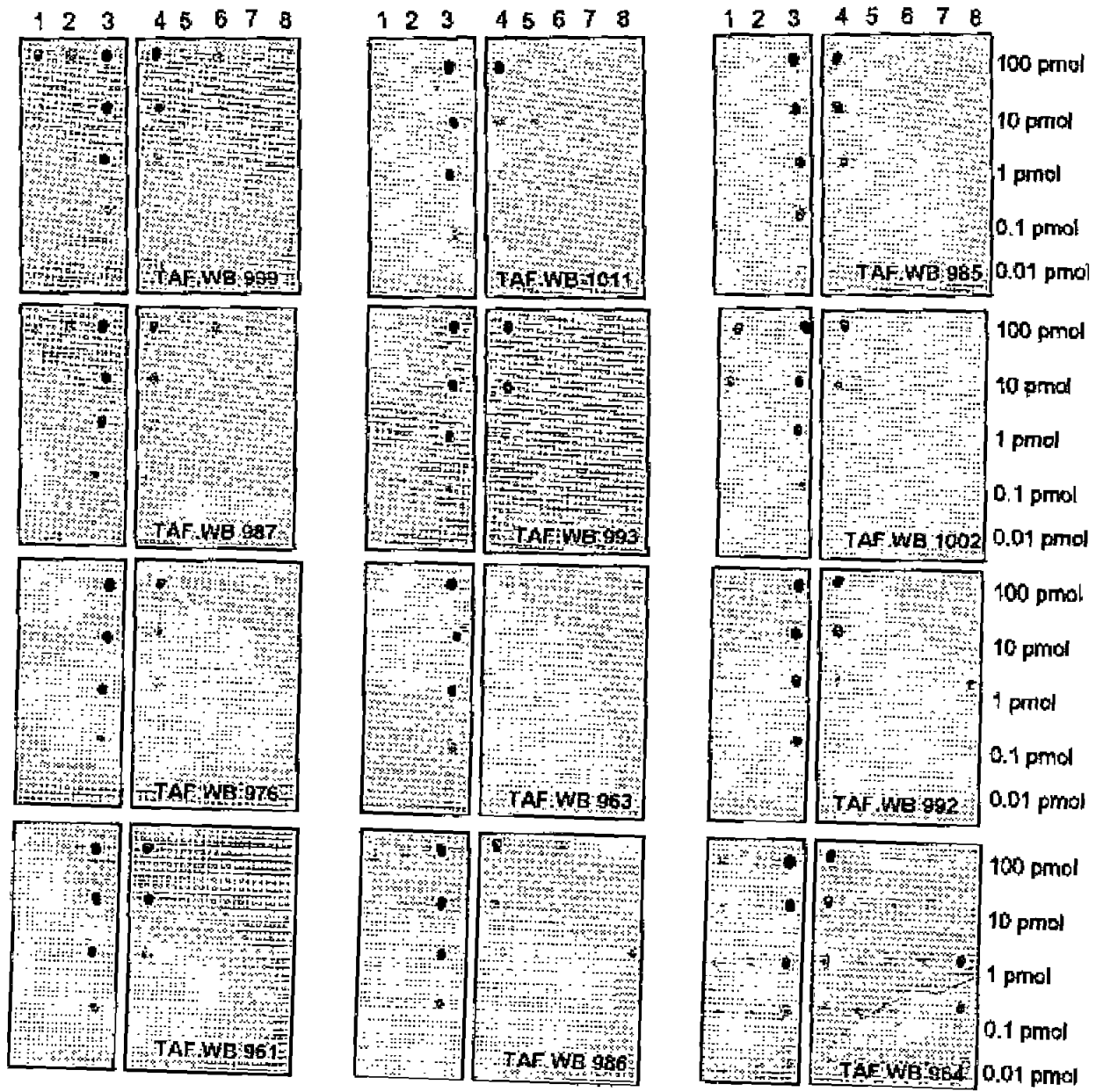


FIG. 5

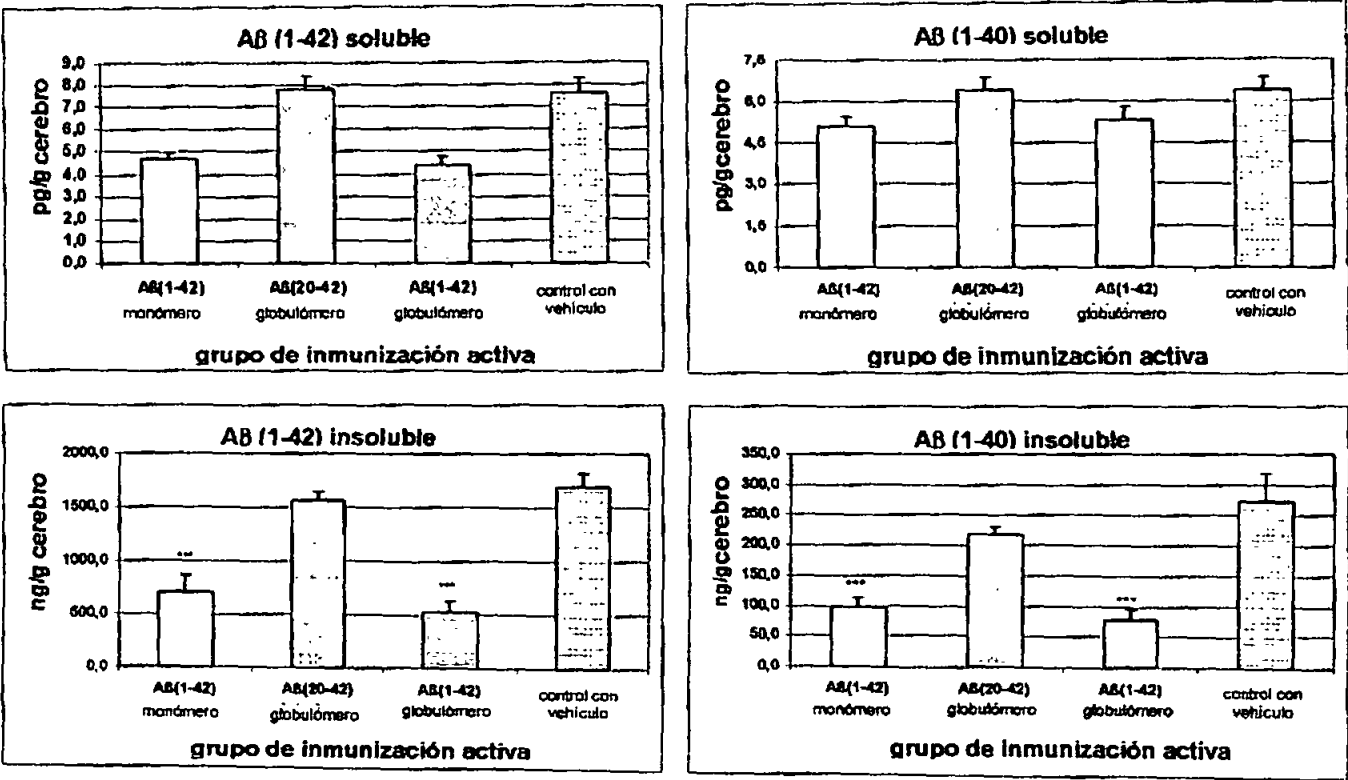


FIG. 6

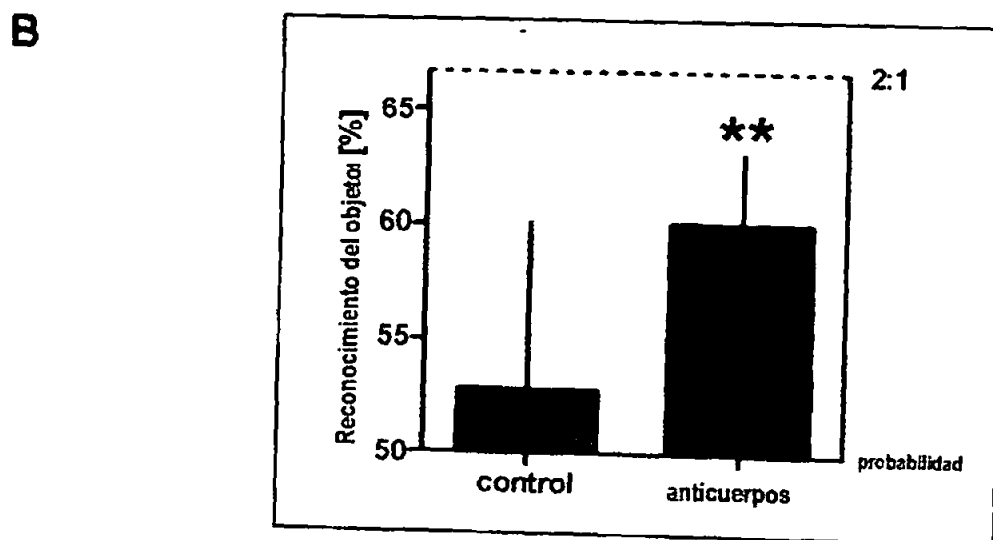
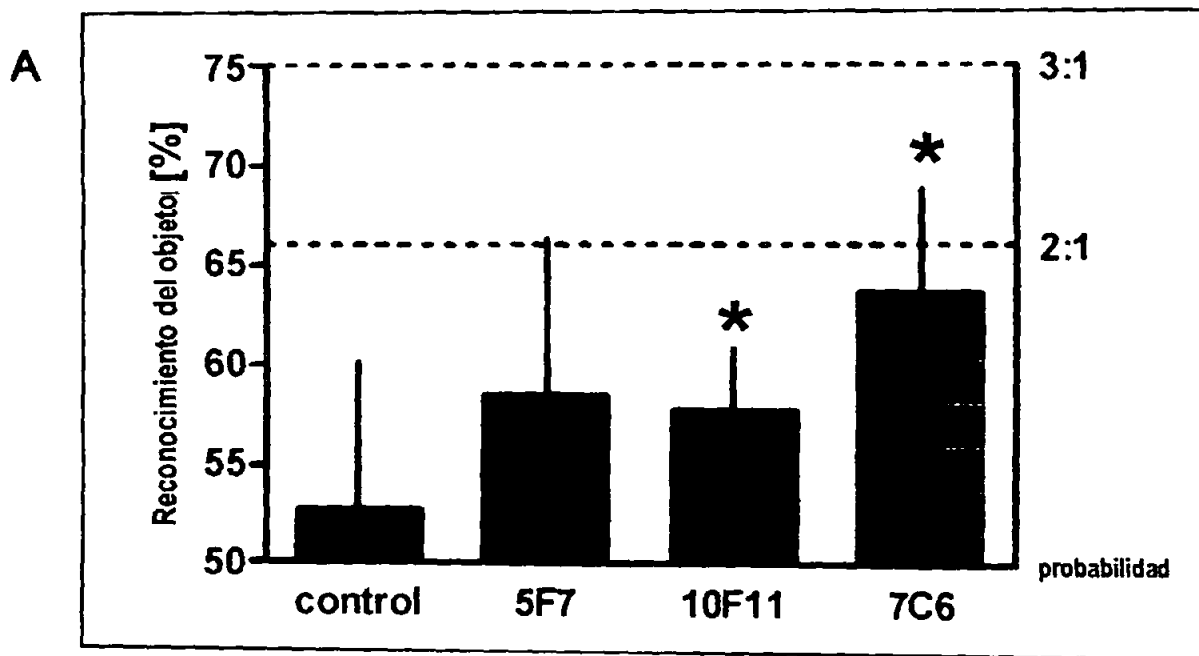
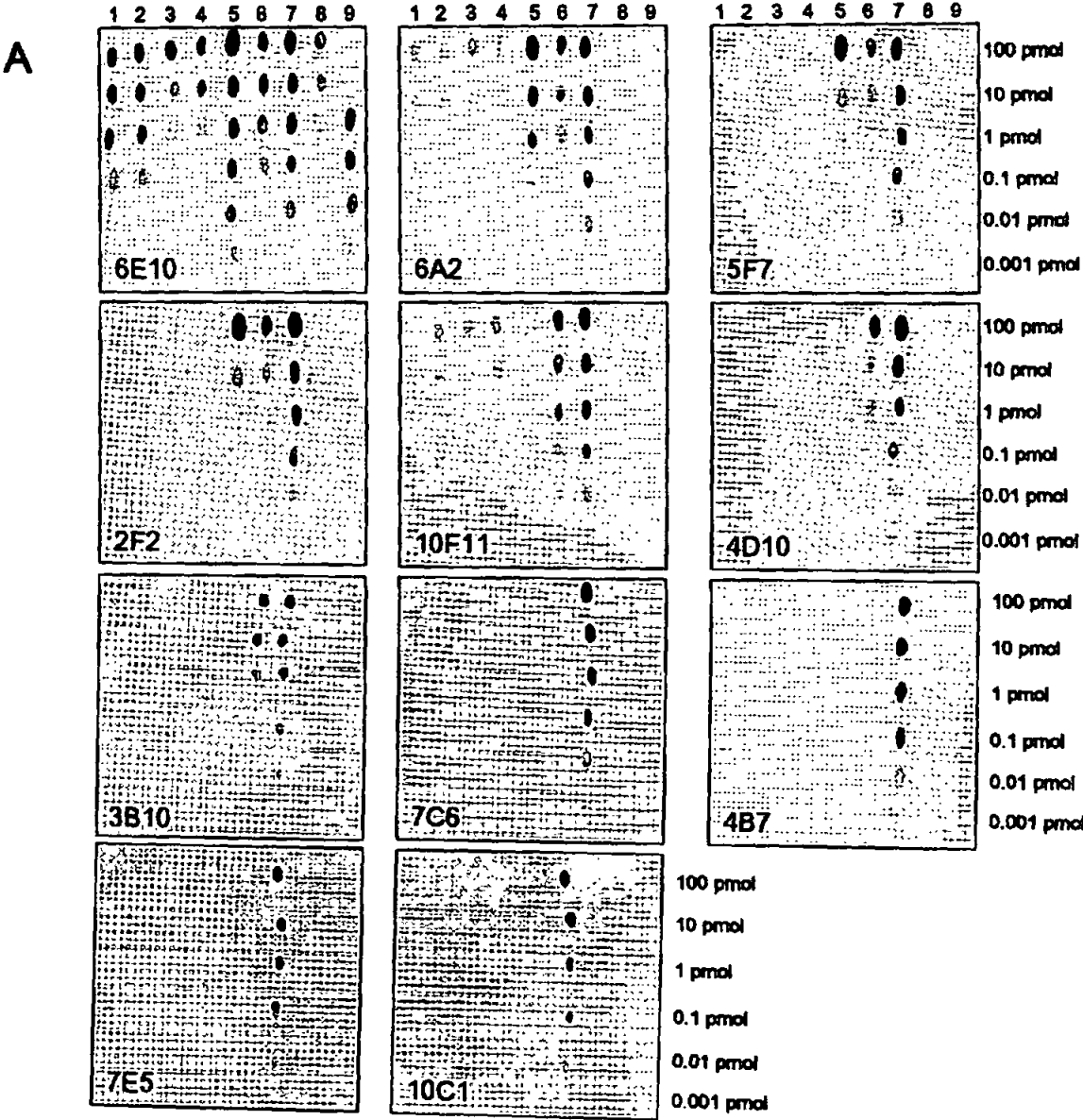


FIG. 7



**B**

|       | Monómero<br>Aβ(1-42),<br>0.1% NH <sub>4</sub> OH | Monómero<br>Aβ(1-40),<br>0.1% NH <sub>4</sub> OH | Monómero<br>Aβ(1-42),<br>0.1% NaOH | Monómero<br>Aβ(1-40),<br>0.1% NaOH | Globulómero<br>Aβ(1-42) | Globulómero<br>Aβ(12-42) | Globulómero<br>Aβ(20-42) | Fibrilla<br>Aβ(1-42) | sAPPα   |
|-------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|---------|
| 6E10  | 10                                               | 17                                               | 505                                | 322                                | 0.2                     | 9                        | 1                        | 510                  | 0.3     |
| 6A2   | 7 840                                            | 5 078                                            | 7 717                              | 38 583                             | 47                      | 198                      | 1                        | 337 831              | > 1 000 |
| 5F7   | 26 655                                           | > 10 000                                         | 23 455                             | 184 182                            | 228                     | 242                      | 1                        | > 10 000             | > 100   |
| 2F2   | 36 827                                           | > 10 000                                         | > 10 000                           | > 10 000                           | 195                     | 274                      | 1                        | > 10 000             | > 100   |
| 10F11 | 83 267                                           | 3 719                                            | 17 417                             | 2 233                              | 77 985                  | 12                       | 1                        | 294 366              | > 1 000 |
| 4D10  | > 10 000                                         | 43 835                                           | > 10 000                           | 35 069                             | > 10 000                | 29                       | 1                        | > 10 000             | > 100   |
| 3B10  | 16 364                                           | 22 500                                           | 45 000                             | > 10 000                           | 30 000                  | 14                       | 1                        | > 10 000             | > 100   |
| 7C6   | > 100 000                                        | > 100 000                                        | > 100 000                          | > 100 000                          | 94 052                  | > 100 000                | 1                        | > 100 000            | > 1 000 |
| 4B7   | > 100 000                                        | > 457 971                                        | > 100 000                          | > 100 000                          | > 100 000               | > 100 000                | 1                        | > 100 000            | > 1 000 |
| 7E5   | > 100 000                                        | > 100 000                                        | > 100 000                          | > 100 000                          | > 100 000               | > 100 000                | 1                        | > 100 000            | > 1 000 |
| 10C1  | > 100 000                                        | > 100 000                                        | > 100 000                          | > 100 000                          | 40 000                  | > 100 000                | 1                        | > 100 000            | > 1 000 |



FIG. 8

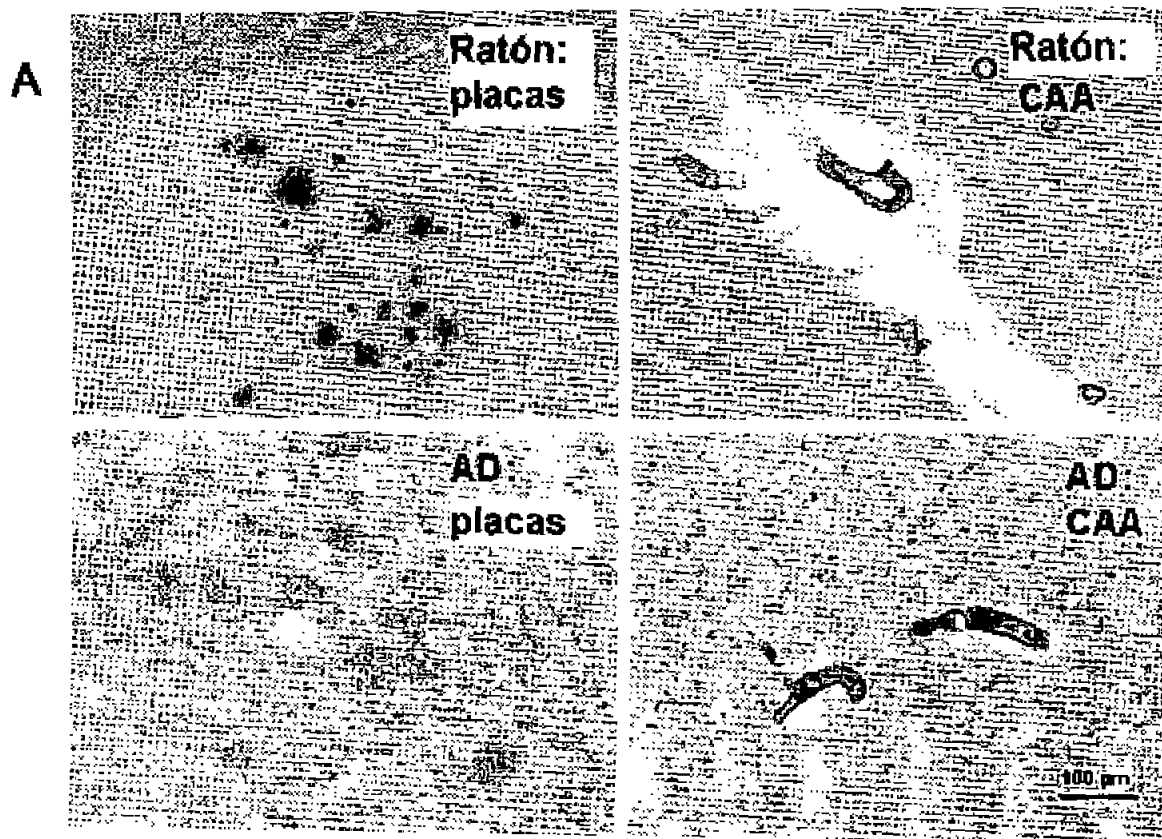


FIG. 8

B

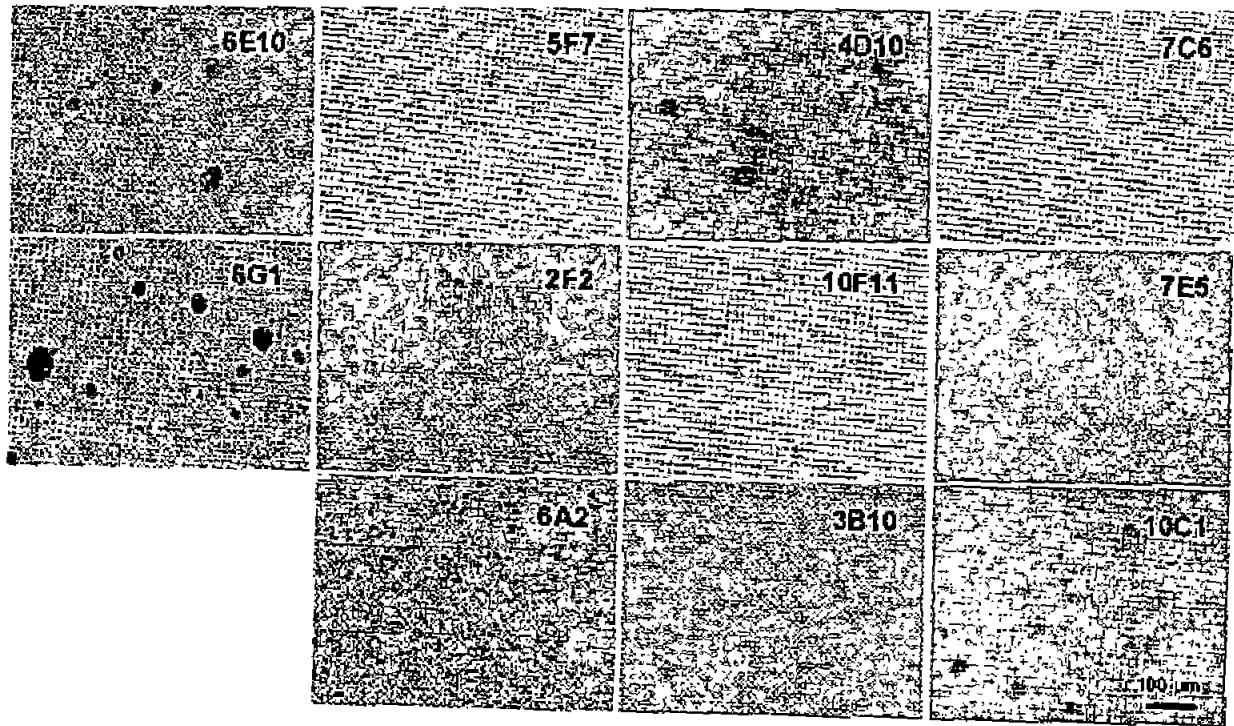


FIG. 8

C

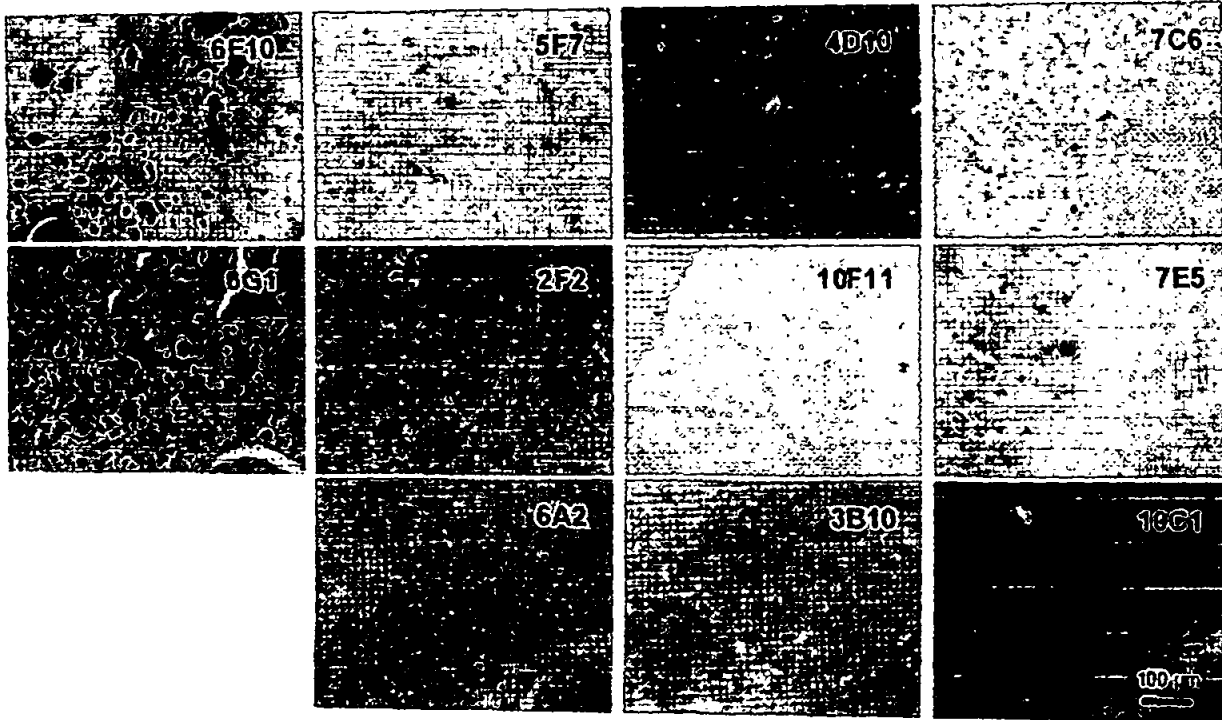
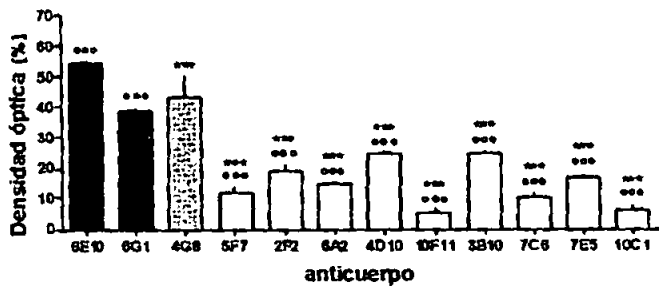
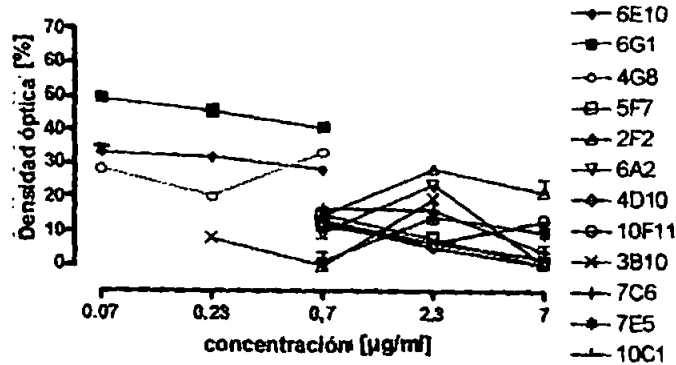


FIG. 8 (D-H)

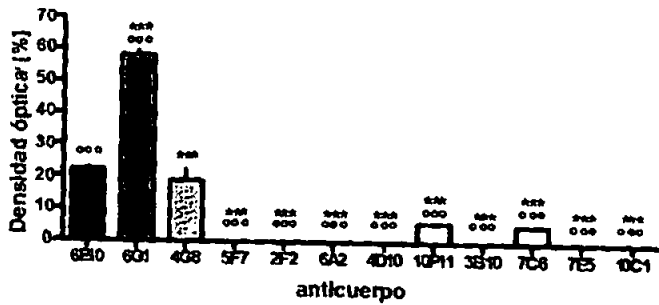
(D) Unión a placas amiloides en Tg2576



(E) Unión a placas amiloides en APP/L



(F) Unión a placas amiloides en AD (RZ55)



(G) Unión a placas amiloides AD (RZ16)

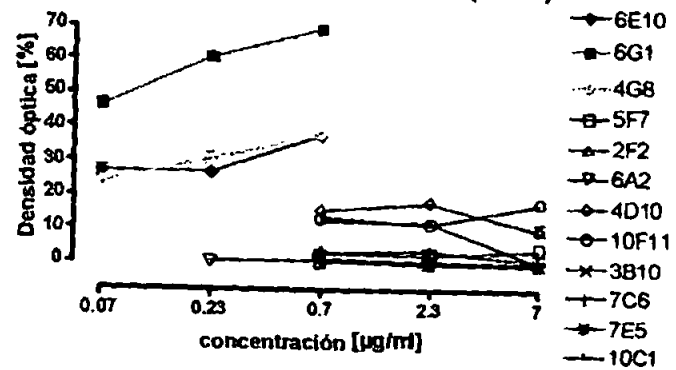


FIG. 8

H

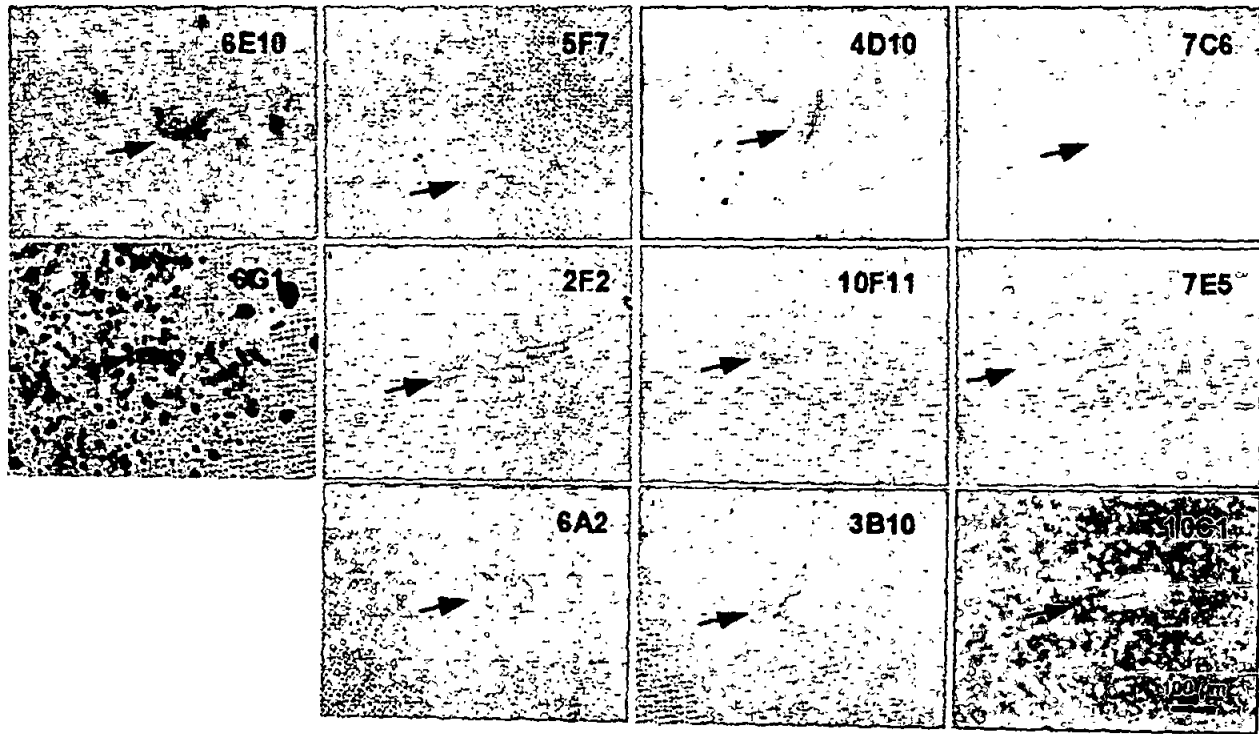


FIG. 9

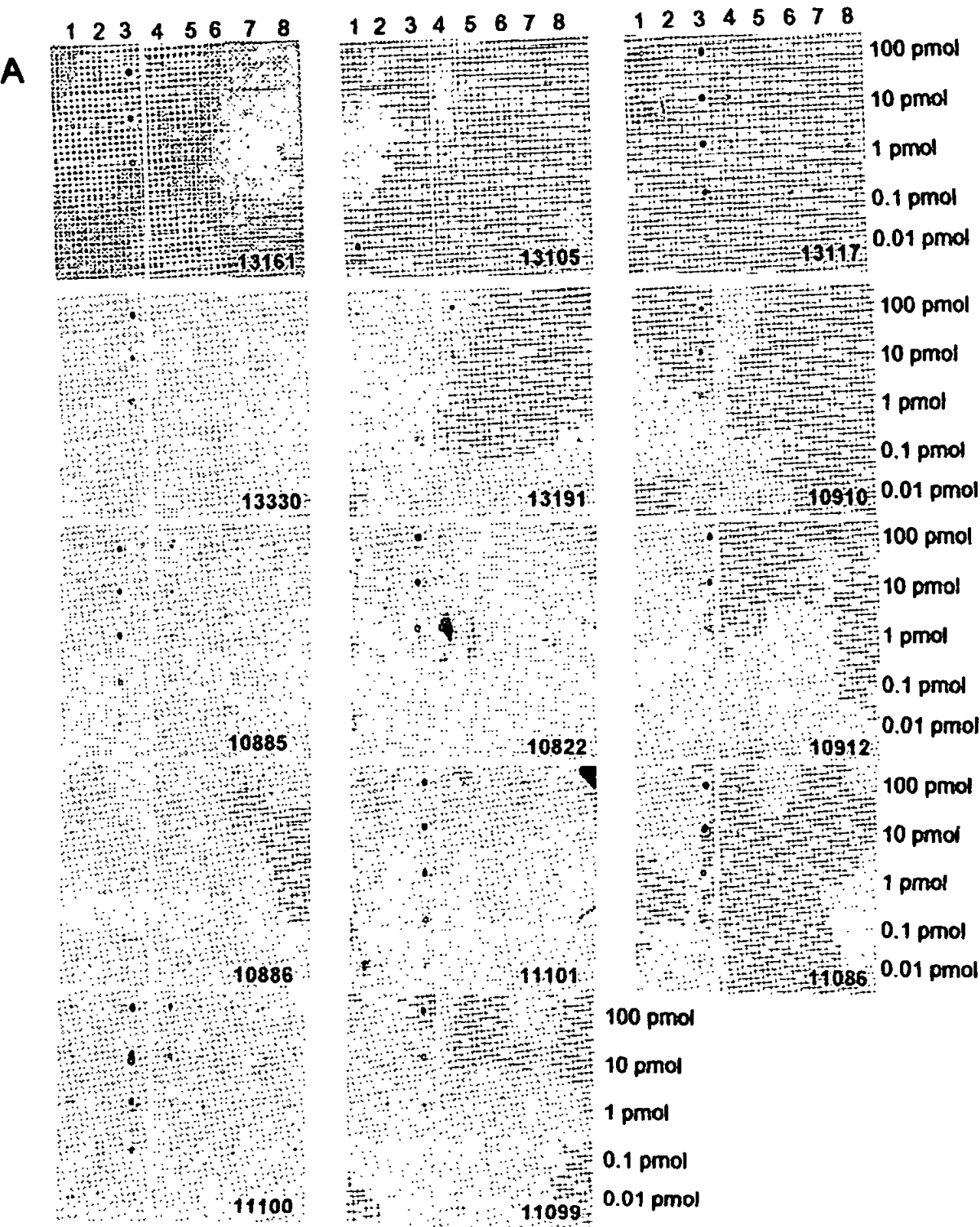


FIG. 9

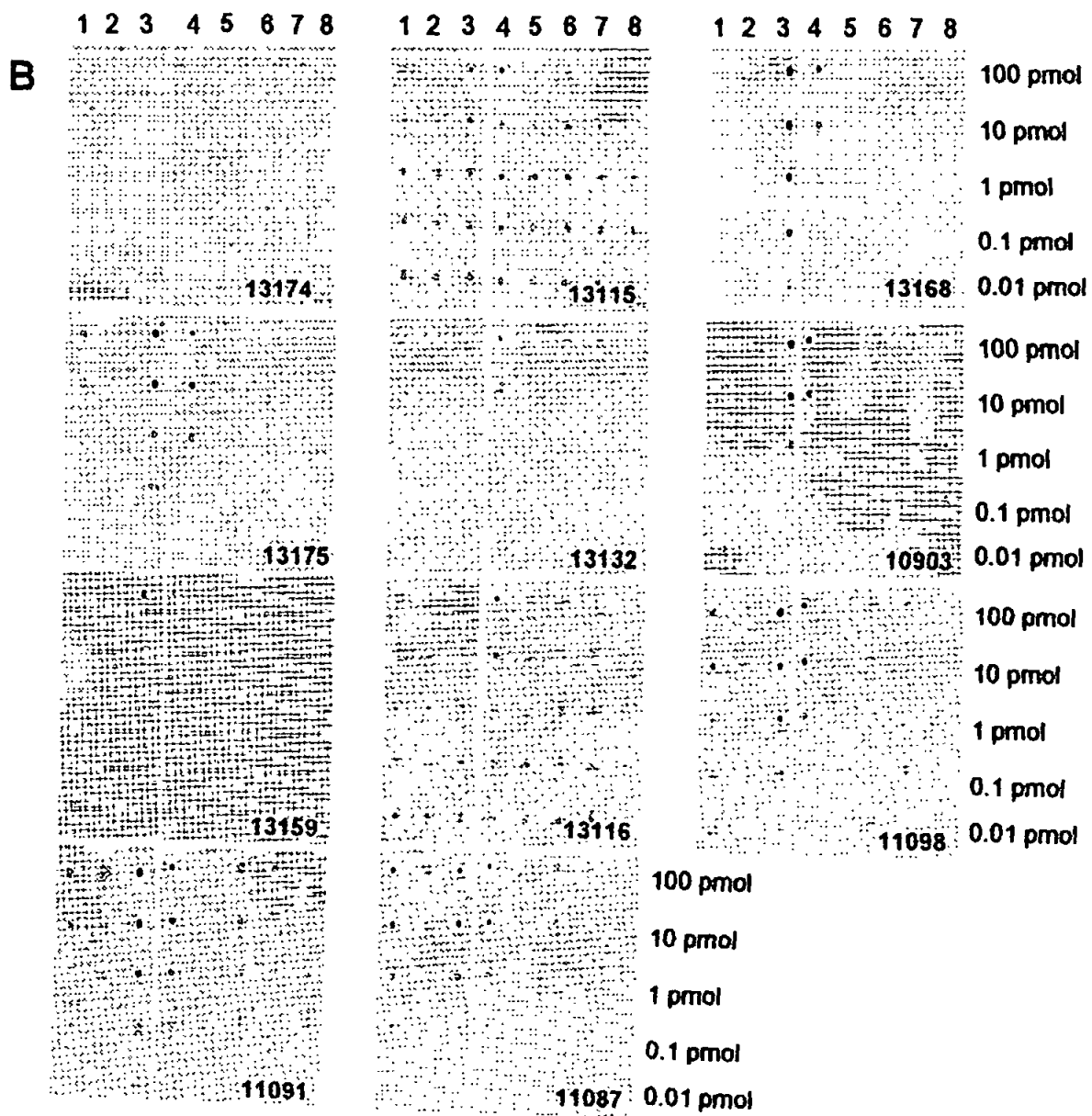


FIG. 9

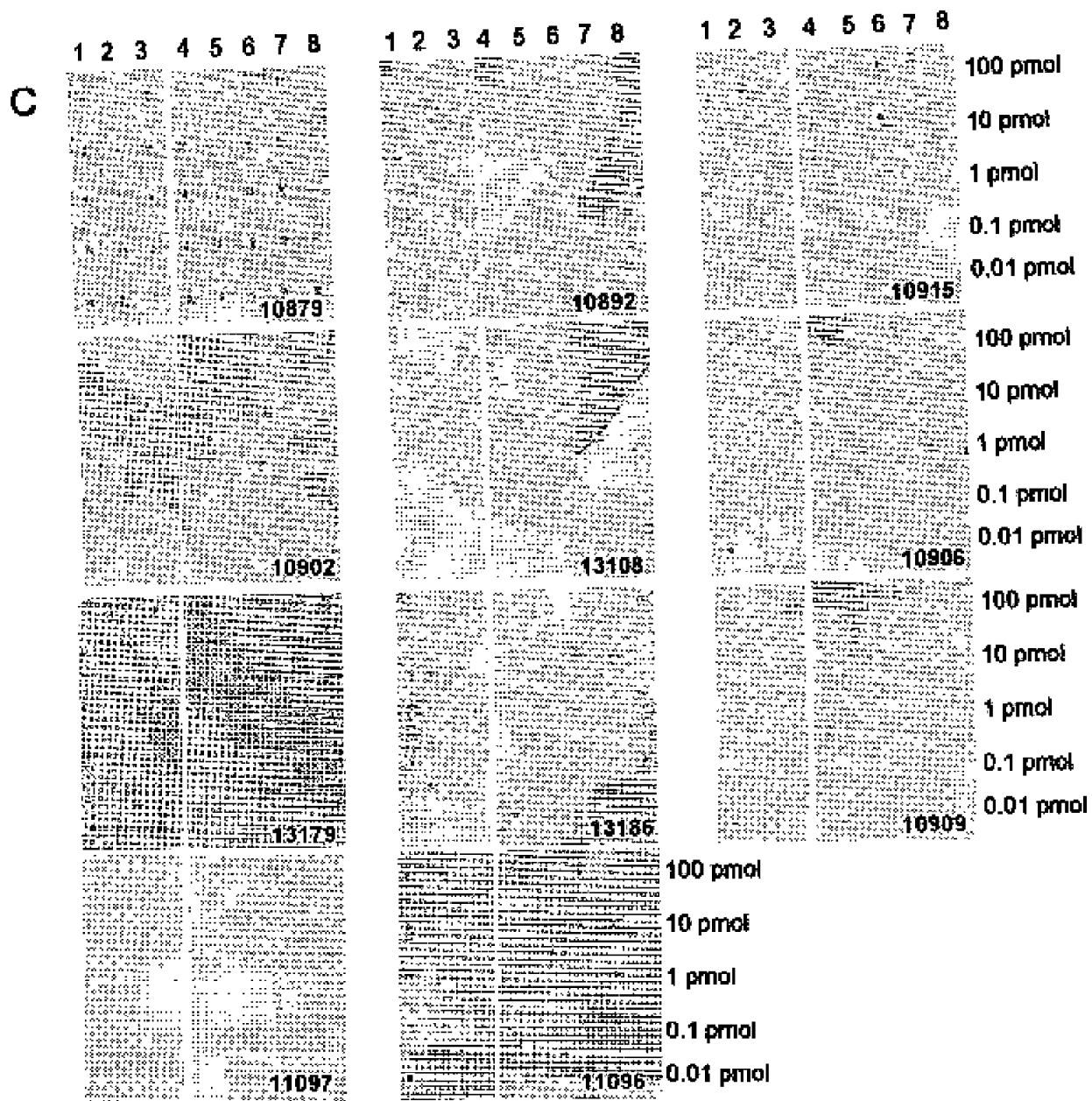




FIG. 9

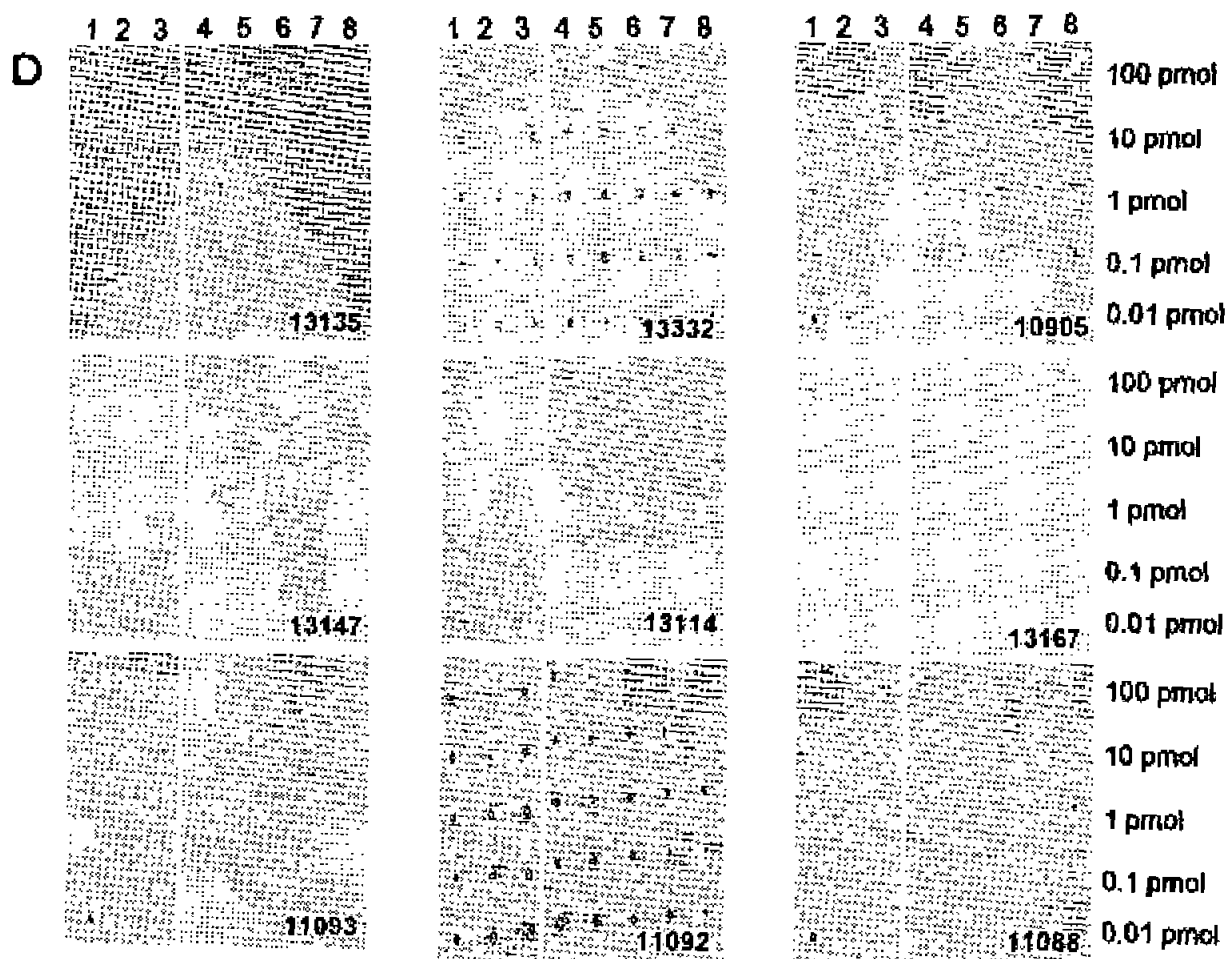


FIG. 10

|                        | <b>Globulómero<br/>7C6 -&gt;BA199<br/>Aβ(20-42)<br/>[pmol/g] de<br/>tejido de<br/>cerebro</b> | <b>Globulómero<br/>10F11-&gt;BA199<br/>Aβ(20-42)<br/>[pmol/g] de<br/>tejido de<br/>cerebro</b> | <b>Globulómero<br/>5F7 -&gt;BA199<br/>Aβ(20-42)<br/>[pmol/g] de<br/>tejido de<br/>cerebro</b> |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RZ16 (AD)</b>       | <b>50,1</b>                                                                                   | <b>10,6</b>                                                                                    | <b>10,2</b>                                                                                   |
| <b>RZ 52 (AD)</b>      | <b>43,9</b>                                                                                   | <b>14,3</b>                                                                                    | <b>13,9</b>                                                                                   |
| <b>RZ 55 (AD)</b>      | <b>13,9</b>                                                                                   | <b>2,9</b>                                                                                     | <b>3,6</b>                                                                                    |
| <b>RZ 92 (control)</b> | <b>&lt; 0,2</b>                                                                               | <b>&lt; 0,06</b>                                                                               | <b>&lt; 0,06</b>                                                                              |

**FIG. 11****A1) VH ML15-5F7**

SEQ ID NO:1

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
 ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
 ATTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
 GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
 GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
 TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
 TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:3

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPQGQGLEWIGMI  
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR  
AAWFAYWGQGTLVTVSA

**A2) VL ML15-5F7**

SEQ ID NO:2

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
 CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
 AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
 TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
 GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATITCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
 GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCC  
 CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:4

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGG  
 TKLEIKR

**B1) VH ML15-10F11**

SEQ ID NO:5

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC  
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCCTAGCTATGTTAT  
 GCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA  
 TTTATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG  
 GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTATATATGGAGCTCAG  
 CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTATTACTGTACAGTAGAGGGTG  
 CTACCTGGGACGGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC  
 GTCTCCTCA

SEQ ID NO:7

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQRPQGGLWIGYI  
YPYNDGTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMELSLTSEDSTVYYCTVEGATW  
DGYFDVWGTGTTVTVSS

**B2) VL ML15-10F11**

SEQ ID NO:6

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTTGGACAA  
 TCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAAAGGA  
 AAAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG  
 CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTTAC  
 TGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG  
 GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCTCAC  
 ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:8

DVVMTQTPLTSLVTIGQSASISCKSSQSLLYSKGKTYLNWLLQRPQGSPKRLI  
YLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPHTFGG  
 GTKLEIKR

**C1) VH ML13-7C6**

SEQ ID NO:9

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGT  
 CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCA  
 TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGCGAAGAGGCTAGAGTGGGTCGCGTCC  
 ATTCATAATAGAGGTACTATCTTCTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTC  
 ACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAG  
 TCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTACAAGAGGCCGGAGTA  
 ACTCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCT  
 CG

SEQ ID NO:11

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPAKRLEWVASIH  
NRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYLQMSSLRSEDTAIYYCTRGRSNSYAM  
DYWGQGTSTVTVSS

**C2) VL ML13-7C6**

SEQ ID NO:10

GATGTTTTGGTGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGGCTTGGAGAT  
 CAAGCCTCCATCTCTTGCCGATCTACTCAGACCCITGTACATCGTAATGGA  
 GACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTC  
 CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCA  
 CGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG  
 GCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTAC  
 ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:12

DVLVTQSPLSLPVRLGDQASISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPKSLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFOGSHVPYTFGGG  
 TKLEIKR

**D1) VH ML15-4B7**

SEQ ID NO:13

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
 CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT  
 GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACA  
 TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA  
 TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAATGAG  
 CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
 TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT  
 CA

SEQ ID NO:15

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI  
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMY<sup>Y</sup>CARTLLRLH  
 FDYWGQGTILTVSS

**D2) VL ML15-4B7**

SEQ ID NO:14

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
 AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA  
 TCAAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA  
 AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT  
 TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG  
 AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCC  
 GTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:16

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSQSLFYRSNOKN<sup>E</sup>LAWYQQKPGQSPKL  
 LIYWASTRESGV<sup>P</sup>DRFTGSGSGTDFTLTIS<sup>S</sup>VKAEDLAVYYCQOYYSYPWTFG  
 GGTKLEIKR

**E1) VH ML15-2F2**

SEQ ID NO:17

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
 AACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
 ATTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
 GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
 GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
 TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
 TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:19

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPGQGLEWIGMI  
GPQSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR  
AAWFAYWGQGLVTVSA

**E2) VL ML15-2F2**

SEQ ID NO:18

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
 CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
 AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
 TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
 GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
 GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCC  
 CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:20

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGG  
 TKLEIKR

**F1) VH ML15-6A2**

SEQ ID NO:21

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC  
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT  
 ACACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG  
 ATTTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA  
 GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA  
 GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG  
 TCACATCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC  
 TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:23

QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVRORPGQGLEWIGMI  
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSHR  
AAWFAYWGQGLVTVSA

**F2) VL ML15-6A2**

SEQ ID NO:22

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT  
 CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG  
 AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC  
 TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTTTGGGGTCCCAGACAGGTTCA  
 GTGGCAGTAGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGA  
 GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCC  
 CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:24

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVOSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFFGVPDRFSGSRSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFOGSHVPPTFGGG  
 TKLEIKR



**G1) VH ML13-4D10**

SEQ ID NO:25

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTAGCCTAATACAGCCCTCACAGAG  
 CCTGTCCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAAGTCTATGGTGT  
 AACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGA  
 TATGGAGAGGTGGAAGGATAGACTATAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTG  
 AGCATCACCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAG  
 TCTGCAAGCTGATGACACTGCCATATACTACTGTGCCAGAACTCCGATG  
 TCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:27

QVQLKQSGPSLIQPSQSLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWR  
GGRIDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNSDVWGT  
 GTTVTVSS

**G2) VL ML13-4D10**

SEQ ID NO:26

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTTGGACAA  
 CCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATATTGATGGA  
 AAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG  
 CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTTAC  
 TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG  
 GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTAC  
 ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:28

DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIY  
LVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHPYTFGGG  
 TKLEIKR

**H1) VH ML15-7E5**

SEQ ID NO:29

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
 CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGA CTACGAAAT  
 GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTCATACA  
 TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGG  
 TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAATGAG  
 CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
 TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT  
 CA

SEQ ID NO:31

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI  
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRLH  
FDYWGQGTILTVSS

**H2) VL ML15-7E5**

SEQ ID NO:30

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
 AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA  
 TCAAAGAAGTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA  
 AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT  
 TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG  
 AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTATAGCTATCC  
 GTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:32

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSOSLFYRSNOKNFLAWYQQKPGQSPKL  
 LIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQOYYSYPWTFG  
 GTKLEIKR

**11) VH ML15-10C1**

SEQ ID NO:33

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC  
 CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT  
 GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA  
 TTAATAGTGGCAGTGGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA  
 TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTTCCTGCAAATGAG  
 CAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC  
 TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACTGTCTCCT  
 CA

SEQ ID NO:35

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYI  
NSGSGTHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMY<sup>Y</sup>CARTLLRLH  
FDYWGQGTILTVSS

**12) VL ML15-10C1**

SEQ ID NO:34

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG  
 AAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGTCGCAAT  
 CAAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAA  
 ACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTGGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT  
 CACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGA  
 AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTTTAGCTATCCGT  
 GGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTCGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:36

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLEFYSRNQKNFLAWYQQKPGQSPKL  
 LIYWASTGESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS<sup>S</sup>VKAEDLAVYYCQOY<sup>E</sup>SY<sup>P</sup>WT<sup>F</sup>FG  
 GGTKLEIKR

J11 VH ML15-3B10

SEQ ID NO:37

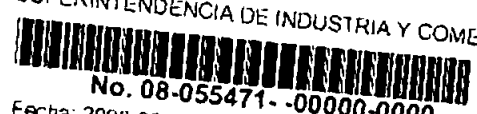
CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC  
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTATGTTAT  
ACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA  
TTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG  
GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTCTACATGGAGCTCAG  
CAGTCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTACTACGTACAGTAGAGGGTG  
GTACCTGGGACGGGTATTTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC  
GTCTCCTCA

SEQ ID NO:38

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF~~TDYV~~HWVKQKPGQGLEWIGYI  
NPYNDGTQYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMELSSLTSEDSTVYYCTVEGGTW  
DGYFDVWGTGTTVTVSS

382

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-055471-00000-0000

Fecha: 2008-05-30 16:07:23  
Tra. 11 PATENTE IYII  
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE  
Eve: 378 FASE NACIONAL  
Folios: 351

cio  
CIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 57
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 324
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

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

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

Edgar Navarro  
Firma Responsable

Fecha 30-05-08

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

353

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
LLOREDA RICAURTE ALICIA  
Apoderado(a) y/o Representante de  
ABBOTT LABORATORIES  
ABBOTT GMBH & CO KG

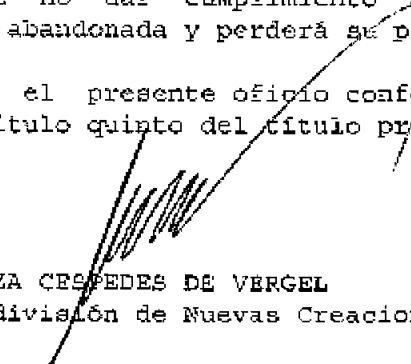
|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 8 55471           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/EP2006/011530 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 30/06/2008        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | Nº 8680           |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

  
ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 JUL. 2008  
jfernand