

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-089247-00000-0000

Fecha: 2008-08-26 16:44:30 Dep: 2020 NULCRACION
Tra: 11 PATENTILLI Lvs: 378 FASLNACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 122

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: GLAXO GROUP LIMITED

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

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex,
Inglaterra.

Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BURBIDGE, Stephen, Anthony; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, K.; GERMASCHEWSKI, Volker; KUMAR, Umesh; PHILPOTT, Karen, Louise; SODEN, Peter, Ernest.

Dirección: GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue,
Harlow Essex CM19 5AW y GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage
Hertfordshire SG1 2NY.

⑤

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra.

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/052928

Fecha: 27/03/07

⑥

Publicación Internacional No. WO 2007/113172 A3

Fecha: 11/10/07

⑦

Título (54) "ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO AMILOIDE BETA"

⑧

Clasificación Internacional (51) C07K 16/18

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

30/03/06

(31) Número de Solicitud

60/787,588

⑨

Comprobante de Pago No. 08-65,886

Fecha: 19-08-08

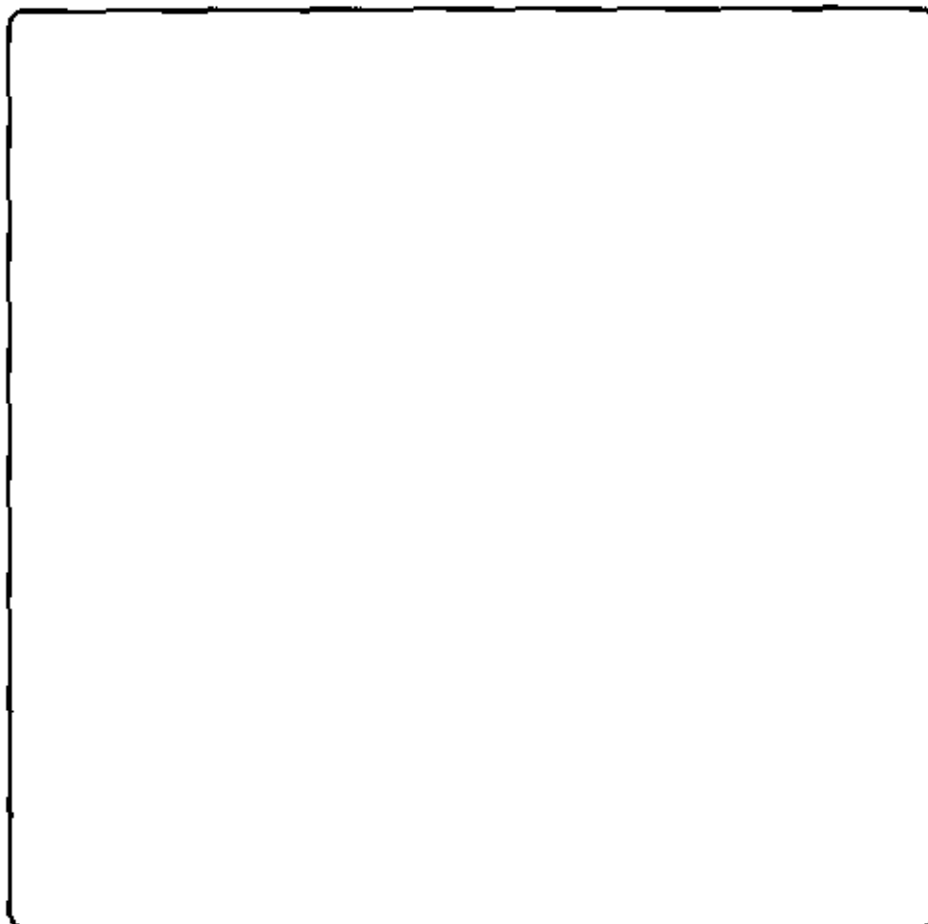
10

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)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Documentos Anexos al Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación y Opinión Escrita.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 899176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 65,886
FECHA : AGOSTO 19 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-089247- -00000-0000

Fecha: 2008-08-26 16:44:30 Dep: 2020 NULIFICACION
No: 11 PATENTILYI Lve: 378 PASLNACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 122

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LEOPESA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	4891725	19/08/2008	11,400,000.00

***** CONCEPTO *****

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

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

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


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

PODER

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

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

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

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

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

Este documento público

2. ha sido firmado por Martin E Buchner

3. actuando como Notario Público

4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres

6. el 26 de agosto de 2004

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

8. Número G499865

9. Sello/Estampilla

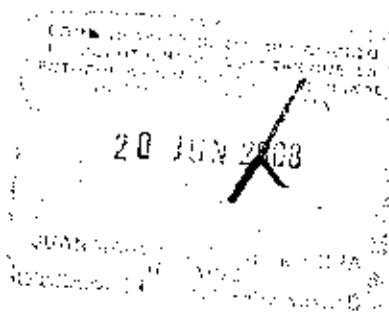
10. Firma: (ilegible)

Sello de la Oficina de Asuntos

M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Exteriores y del Commonwealth

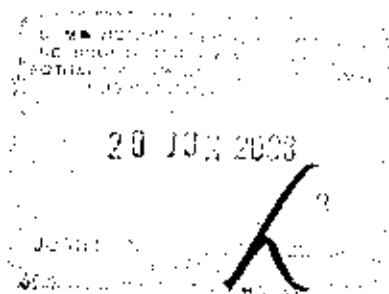
Por el Secretario de Estado

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

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

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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

CERTIFICO:

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

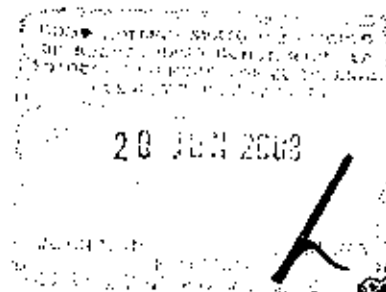
QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

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

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



Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

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

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E. Buchner**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/stamp de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté

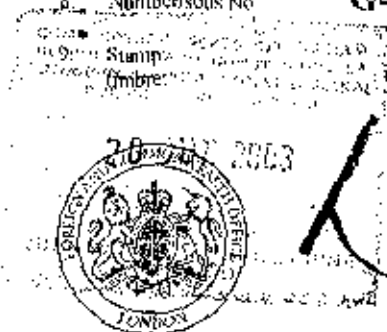
6. the/le **26 August 2004**

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

8. Number/sous No

G499865

10. Signature: **M. Mulaghan**



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

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

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

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

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

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

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

Dado y firmado

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

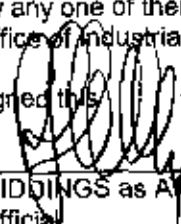
domiciled at **Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlessex UB6 0NN
Great Britain**

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

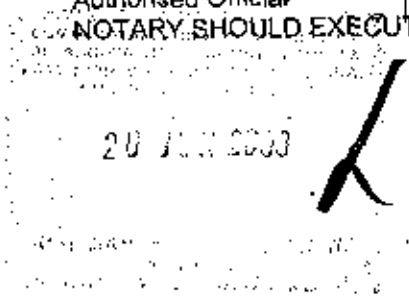
Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property,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

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

Given and signed this **23 AUG 2004**


Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE


20 JUL 2004

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 26/08/08	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18			
(71) Solicitante(s) GLAXO GROUP LIMITED			
(72) Inventor(es) BURBIDGE, Stephen, Anthony; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, K.; GERMASCHEWSKI, Volker; KUMAR, Umesh; PHILPOTT, Karen, Louise; SODEN, Peter, Ernest.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/787,588	30-03-06	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-10-08		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 11/10/07	
Fecha de presentación de la solicitud: 27/03/07		N° publicación: WO 2007/113172 A3	
No. de solicitud PCT/EP2007/052928			
(54) Título: "ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO AMILOIDE BETA"			

7

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/18	
(22) Fecha de solicitud: 26-08-08		(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/787,588	30-03-06	US
		(72) Inventor(es): BURBIDGE, Stephen, Anthony; ELLIS, Jonathan, Henry; FORD, Susannah, K.; GERMASCHEWSKI, Volker; KUMAR, Umesh; PHILPOTT, Karen, Louise; SODEN, Peter, Ernest.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 30-10-08		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 11/10/07
	Fecha de presentación de la solicitud: 27/03/07		N° publicación: WO 2007/113172 A3
	No. de solicitud PCT/EP2007/052928		
(54) Titulo: "ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO AMILOIDE BETA"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido 1- amiloide y que comprende las siguientes CDR:

CDRH1: DNGMA (SEC ID N°: 1)

CDRH2: FISNLAYSIDYADTVTG (SEC ID N°: 2)

CDRH3: GTWFAY (SEC ID N°: 3)

dentro de una región variable de cadena pesada humana procedente de la familia génica VH3 y:

CDRL1: RVSQSLLHSNGYTYLH (SEC ID N°: 4)

CDRL2: KVSNRFS (SEC ID N°: 5)

CDRL3: SQTRHVPYT (SEC ID N°: 6)

dentro de una región variable de cadena ligera humana procedente de la secuencia de aminoácidos descrita en GenPept con la entrada CAA51135 (SEC ID N°: 24).

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: GLAXO SMITHKLINE Attn: Valentin, Jill Barbara Corporate Intellectual Property (CN924-1) 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE		NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION	
		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD	
		(PCT No. SEP 2007)	
		Date of mailing (day/month/year) 24/09/2007	
Applicant's or agent's file reference JBV/PB61927		ATTN: JBV KA PS 25/9/07 IPM ON UPDA FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/EP2007/052928		International filing date (day/month/year) 27/03/2007	
Applicant GLAXO GROUP LIMITED			

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

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-9016	Authorized officer Marc Peeters
--	---

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

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

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

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

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

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume IA, paragraph 295).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

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

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

When?

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

Where not to file the amendments?

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

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

How?

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

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

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

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

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

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

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

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference JBV/PB61927	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2007/052928	International filing date (day/month/year) 27/03/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 30/03/2006
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

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

This international search report consists of a total of 6 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

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

ANTIBODIES AGAINST AMYLOID-BETA PEPTIDE

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2007/052928

14

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

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

3. Additional comments:

14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/052928

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K16/18 A61P25/28 A61K39/395

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 A61P A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/080419 A (NEURALAB LTD; WYETH CORP [US]; BASI GURIO [US]; SALDANHA JOSE W [GB];) 23 September 2004 (2004-09-23) table 18 examples 1-12	1-20
X	WO 2004/032868 A (RINAT NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; LEVKOWITZ GIL [US]) 22 April 2004 (2004-04-22) paragraph [0088] table 2 examples 1-8	12-14, 17-19
Y		15
	----- -/--	

☒ 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* documents 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

- *I* 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
- *3* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 2007

Date of mailing of the international search report

24/09/2007

Name and mailing address of the ISA/

 European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 661 opu nl
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP2007/052928

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORGAN, A ET AL: "THE N-TERMINAL END OF THE CH2 DOMAIN OF CHIMERIC HUMAN IGG1 ANTI-HLA-DR IS NECESSARY FOR C1Q, FCGAMMARI AND FCGAMMARIII BINDING" IMMUNOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 86, no. 2, October 1995 (1995-10), pages 319-324, XP001106372 ISSN: 0019-2805 abstract	15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2003)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/052928

17

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.: 18 (with respect to a method of treatment)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ 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:

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

Remark on Protest

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

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/052928

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004080419	A	23-09-2004	CA 2518275 A1	23-09-2004
			EP 1613347 A2	11-01-2006
WO 2004032868	A	22-04-2004	AU 2003279216 A1	04-05-2004
			BR 0315157 A	09-08-2005
			CA 2501945 A1	22-04-2004
			EP 1633786 A2	15-03-2006
			JP 2006519762 T	31-08-2006
			KR 20050071564 A	07-07-2005
			MX PA05003621 A	19-10-2005

XP-001106372

P.D.	10-1995
P.	319-324

The N-terminal end of the C_H2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, FcγRI and FcγRIII binding

A. MORGAN, N. D. JONES, A. M. NESBITT, L. CHAPLIN, M. W. BODMER & J. S. EMTAGE
Celltech Therapeutics, Slough

SUMMARY

We have found that amino acid residues necessary for C1q and FcγR binding of human IgG1 are located in the N-terminal region of the C_H2 domain, residues 231-238, using a matched set of engineered antibodies based on the anti-HLA-DR antibody L243. Changing the leucine 235 in the C_H2 region of IgG3 and IgG4 to glutamic acid was already known to abolish FcγRI binding. We have confirmed this for IgG1 and also found a concomitant abolition of human complement lysis with retention of FcγRIII-mediated function. Changing the glycine at 237 to alanine of IgG1 also abolished FcγRI binding and reduced human complement lysis and FcγRIII-mediated function. Exchanging the whole region 233-236 with the sequence found in human IgG2, abolished FcγRI binding and human complement lysis and reduced FcγRIII-mediated function of IgG1. In contrast, a change in the previously described C1q-binding motif, from lysine at 320 to alanine, had no effect on IgG1-mediated complement lysis.

INTRODUCTION

The gamma-1 isotype of human IgG, like IgG3, binds to FcγR1 and, when complexed with its cognate antigen, activates complement and binds to FcγRII and FcγRIII. Conversely, human IgG2 and IgG4 are relatively inactive isotypes; both fail to activate the classical complement pathway and IgG4 binds to FcγRI (reviewed in refs 1 and 2).

Localization of amino acid residues of IgG that interact with FcγR1 in the C_H2 domain of human IgG is well established.³⁻⁸ Amino acid sequence comparisons of the C_H2 domains of antibodies from different species and subclasses that bind well to FcγR1 suggested that a region at the N-terminal end of C_H2 comprising residues Leu234-Ser239 (using the Kabat Eu numbering system)⁹ is critical for interaction with FcγR1. The motif Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Pro238, Ser239, is present in all IgG isotypes with high affinity for FcγR1.³ Domain exchanges between immunoglobulins with different Fc effector functions have demonstrated the importance of C_H2 for FcγRI binding,⁵⁻⁷ in particular the residue 235. Replacement of the Leu residue at position 235 with a Glu residue reduces the affinity of IgG3 for FcγRI by 100-fold.^{4,5}

The same Leu235 to Glu change, when performed on an IgG4 variant of OKT3,¹⁰ abolished its FcγRI binding and, consequently, its mitogenic properties.

Although the sequence requirements for FcγRIII binding have been less extensively studied, Samra *et al.*¹⁰ have identified the C_H2 domain residues 234-237 as important for IgG3 binding to all three Fc receptors. The relative importance of each residue differs with each Fc receptor, with 235 and 237 being most important for FcγRIII-mediated cell killing.

In contrast, another Fc-mediated function, C1q binding and subsequent complement activation, appears to require the carboxyl terminal half of the C_H2 domain.¹¹ Tao *et al.*^{11,12} following sequence analysis of polymorphisms in the C_H2 domain of human IgG, also identified the importance of the C-terminal region of C_H2. With a Pro to Ser change at 331 in IgG1 they abolished complement lysis and reduced C1q binding.¹² Using inter- and intradomain switch variants of CAMPATH-1, Greenwood *et al.*¹³ further endorsed the importance of the C-terminal end of C_H2. Complement lysis could be restored to human IgG4 with just the carboxyl terminal of C_H2 from residue 292 of IgG1 and not the N-terminal half or any other domain. Duncan & Winter¹⁴ identified a motif in C_H2 of Glu318, Lys320 and Lys322 of the mouse IgG2b isotype. Changing any of these residues abolished C1q binding, as did the use of competitive peptides of sequences in this region. However, the C1q motif residues are also found in antibodies that do not fix complement, suggesting that these residues may well be necessary but not sufficient for complement activation.

In this paper we describe experiments using a matched set of engineered antibodies based on the anti-HLA-DR antibody L243.¹⁵ Amino acid residues necessary for C1q, FcγRI and

Received 28 November 1994; revised 1 March 1995; accepted 8 June 1995.

Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; C1q, part of the first component of the complement cascade; C_H2, constant domain two of the IgG heavy chain; FcγR, receptors for the Fc portion of human IgG; IgG, immunoglobulin gamma.

Correspondence: Dr A. Morgan, Infection and Immunity Research Group, King's College London, Campden Hill Road, London W8 7AH, UK.

© 1995 Blackwell Science Ltd

319

FcγRIII binding of human IgG1 map to the N-terminal end of the C_γ2 domain. Changing the Leu235 to Glu abolished FcγRI binding and, unexpectedly, also abolished human complement lysis. FcγRIII-mediated function was retained. In contrast, a change in the previously described C1q binding motif,¹⁴ from Lys to Ala at 320, had no effect on complement lysis or C1q binding. Gly to Ala at 237 abolished FcγRI binding and reduced complement lysis and FcγRIII-mediated function. Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 further confirmed the importance of this sequence in IgG1, in that FcγRI binding and complement lysis were abolished and FcγRIII-mediated function was reduced.

MATERIALS AND METHODS

Construction and production of genes encoding Fc engineered antibodies

cDNA for the variable regions of L243 (murine IgG2a anti-HLA DR)¹⁵ heavy and light chains were synthesized using reverse transcriptase to produce single-stranded cDNA copies of the mRNA present in the total RNA, followed by polymerase chain reaction (PCR) on the cDNA with specific oligonucleotide primers. The combinations of primers employed enabled the PCR products for V_H and V_L to be cloned directly into the appropriate expression vector to produce chimeric (mouse-human) heavy (Fig. 1a) and light (Fig. 1b) chains and for these genes to be expressed in

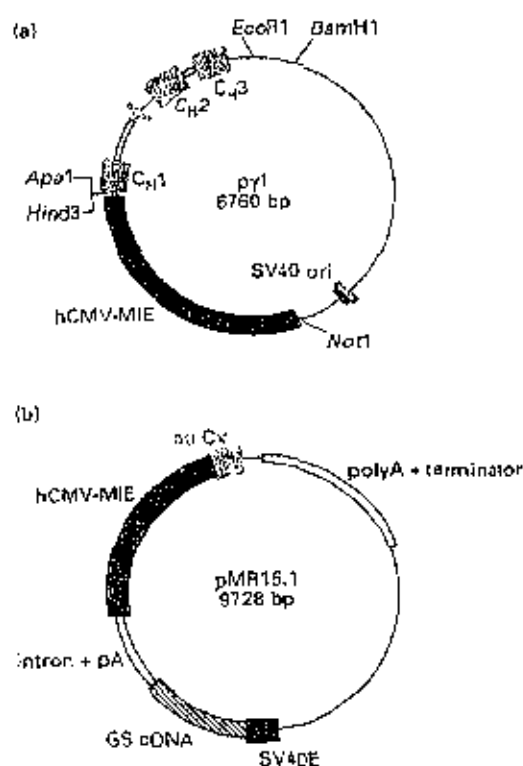


Figure 1. Expression vectors. PCR products were cloned directly into expression vectors to produce chimeric (a) heavy and (b) light chain expression in mammalian cells.

Table 1. Human isotype mutants

Gene	Residue	From	To	Name
G1	235	L	E	G1(L235E)
G1	235	L	A	G1(L235A)
G1	237	G	A	G1(G237A)
G1	320	K	A	G1(K320A)
G4	235	L	E	G4(L235E)
G1	231-278	APELLGGP	AP-PVAGP	G1/C3L-hinge

mammalian cells to produce chimeric antibodies of the desired isotype IgG1, IgG2 and IgG4.¹⁶ PCR mutagenesis was used to affect amino acid changes (Table 1) to make human isotype mutants. Antibody for biological evaluation was produced by transient expression of the appropriate heavy and light chain pairs after co-transfection into Chinese hamster ovary (CHO) cells using calcium phosphate precipitation.¹⁷ Antibody was purified from the resulting culture medium by batch elution from protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia Biotech, Milton Keynes, UK) using a modification of Colcher *et al.*¹⁸ After dialysis into RPMI-1640 (Gibco BRL, Paisley, UK) the antibodies were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)¹⁹ against in-house antibody standards.

Antigen-binding potency of antibodies

To demonstrate that the antigen-binding potency of the antibody was unaffected by the changes made in the Fc, a fluorescence-activated cell sorter (FACS)-based competition binding assay was constructed using saturating levels of FITC (Sigma, Poole, UK)-labelled murine L243 and a B-lymphoblastoid cell line (JY) bearing high levels of HLA-DR. All dilutions, manipulations and incubations were done on ice in phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) containing 0.1% sodium azide (BDH, UK) and 5% fetal calf serum (FCS; Sigma). None of the changes in the Fc portion of the molecule affected antigen-binding ability (representative results shown in Fig. 2).

Assessment of FcγRI binding

FcγRI binding was measured based on the ability of the engineered antibodies to compete for binding with FITC-labelled murine IgG2a to interferon-γ (IFN-γ)-stimulated U937 cells according to published methods.⁸

FcγRIII binding measured by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)

Fresh human peripheral blood mononuclear effector cells (PBMC) were prepared by density gradient centrifugation for each experiment. PBMC were adjusted to 1×10^7 cells/ml in RPMI-1640 and 10% FCS, in which all manipulations, dilutions and incubations were done. JY cells were labelled with $1 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Amersham Int., Amersham, UK) for 1 hr at room temperature, washed and resuspended at 2×10^6 /ml. Serial antibody dilutions were prepared in 25 μl . Control wells to establish the spontaneous and maximum release of label were also set up. Target ^{51}Cr -labelled JY cells in 10 μl and effector cells in 25 μl were added to all wells for 4 hr at 37° after which 100 μl of EDTA saline at 4° was added to stop any further cell killing. Microtitre plates were centrifuged at

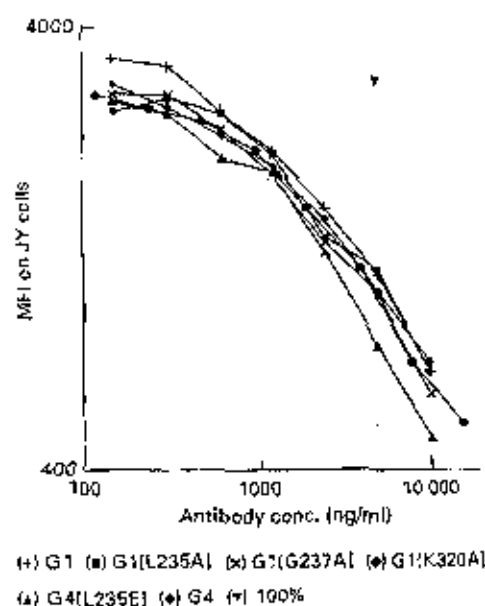


Figure 2. Antigen-binding potency of antibodies. A fixed amount of FITC (Sigma)-labelled murine L243 (1 µg/ml) and increasing amounts of engineered antibodies were incubated with a B-lymphoblastoid cell line (JY) bearing high levels of HLA-DR. Median fluorescence intensity (MFI) was measured using a FACS and plotted against the concentration of engineered antibody.

200 µg and 100 µl supernatant was removed and counted in a gamma-counter. Percentage cell lysis was calculated by subtracting the background from all values. They were then expressed as a percentage of the adjusted maximum release. The ADCC assay performed in this way measures predominantly natural killer (NK) cell-mediated FcγRII-dependent cell killing.¹⁰

Complement lysis

Freshly isolated human serum was used as a source of complement and lytic ability was measured using ⁵¹Cr-labelled JY cells and standard techniques.²⁰

Direct binding of C1q

JY cells were coated with a saturating level of antibody. Binding of FITC-labelled human C1q (Sigma) was then revealed by FACS analysis according to published methods.²¹

RESULTS

Amino acid residues necessary for FcγRI binding

Changes in the N-terminal region of the C_H2 domain of IgG1 had profound effects on binding to FcγRI (Fig. 3). As expected, wild-type IgG1 bound well to FcγRI, IgG4 about 10 times less well and IgG2 did not bind at all. We have confirmed that the Leu235 to Glu change in human IgG4 abolished its low FcγRI binding and that the same change in IgG1 completely abolished FcγRI binding. Ala at 235 reduced (by about 100-fold) but did not ablate FcγRI binding. Changing Gly237 to Ala of IgG1 also abolished FcγRI, as did exchanging the whole region 233–236 with the sequence

© 1995 Blackwell Science Ltd, *Immunology*, 86, 319–324

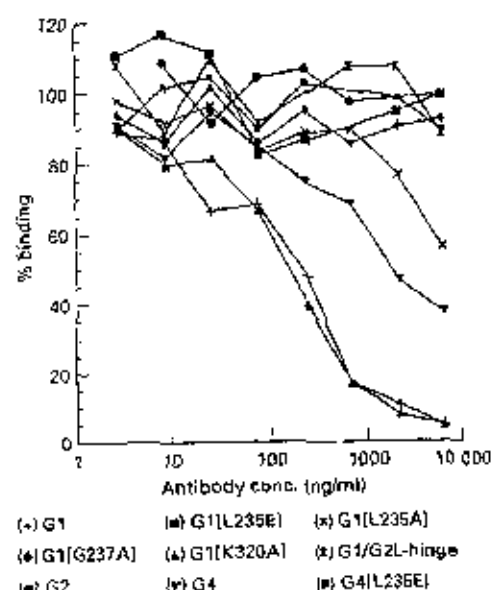


Figure 3. Assessment of FcγRI binding. A fixed amount of FITC (Sigma)-labelled murine IgG2a (1 µg/ml) and increasing amounts of engineered antibodies were incubated with IFN-γ stimulated U937 cells bearing high levels of FcγRI. MFI was measured using a FACS and percentage inhibition of the IgG2a-alone MFI value was calculated and plotted against the concentration of engineered antibody.

found in human IgG2. The G1[K320A] change had no effect on FcγRI binding.

Amino acid residues necessary for FcγRII-mediated cytotoxicity

Not all the changes made in the N-terminal region of the C_H2 domain, residues 233–237, affected FcγRII-mediated function (Fig. 4 and Table 2). L243 IgG2 was unable to mediate peripheral blood mononuclear cell cytotoxicity (ADCC) of

Table 2. Summary of L243 isotype series

L243	R1*	R1††	Complement‡
G2	> 10	> 100 000	> 20/0
G4	1–2	10 000 ex	> 20/0
G4[L235E]	> 10	> 100 000	> 20/0
G1	0–13	5	0–6/65
G1/G2Lh	> 10	500	> 20/0
G1[L235E]	> 10	40	> 20/0
G1[L235A]	10 ex	9	> 20/0
G1[G237A]	> 10	10 000 ex	2–0/20
G1[K320A]	0–1	10	0–6/70

* Antibody (µg/ml) necessary for 50% inhibition of binding of FITC-labelled mouse IgG2a antibody to U937 cells.

† Antibody (ng/ml) necessary for half maximal cell killing in ADCC

‡ Antibody (µg/ml) necessary for half maximal cell killing by human complement and percentage plateau cell killing.

ex, extrapolated value.

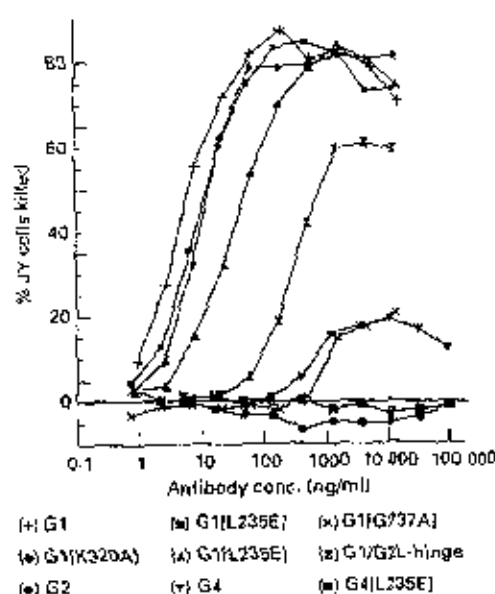


Figure 4. FcγRIII binding measured by ADCC. ^{51}Cr -labelled JY cells were incubated with increasing amounts of engineered antibodies and fresh human PBMC 4 hr at 37°. Cell lysis was calculated by subtracting the background from all values which were then expressed as a percentage of the adjusted maximum release and plotted against the concentration of engineered antibody.

HLA-DR-positive JY lymphoblastoid cells at concentrations up to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. IgG4 caused a low level of ADCC (20% maximum killing at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) that could be abrogated by the Leu235 to Glu change. Wild-type IgG1 was a potent mediator of cell killing, giving 50% cell death at 5 ng/ml antibody. Gly to Ala at 237 reduced the IgG1 wild-type killing to the level seen with IgG4. Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 gave intermediate levels of killing, with 500 ng/ml needed for 50% cell death. In contrast, changes at 235 in IgG1 had minimal effect on ADCC.

Changing the Leu235 to Ala gave levels of killing comparable with the G1 wild type (9 ng/ml for 50% cell death), and changing the Leu235 to Glu reduced ADCC a little (40 ng/ml for 50% cell death). A change in the previously described C1q binding motif,¹² from Lys to Ala at 320, had no effect on the ability of IgG1 to mediate ADCC.

Amino acid residues necessary for human complement-mediated lysis

The ability of L243 to fix human complement was not affected by all the changes made in the N-terminal region of the C_H2 domain, residues 233–237 (Fig. 5). Wild-type IgG1-mediated potent killing with 600 ng/ml giving half maximum cell killing (64% maximum). IgG2 and IgG4 caused no cell killing even at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The Gly to Ala at 237 gave an intermediate level killing (20% maximum killing at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 failed to cause lysis even at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Changes at 235 in IgG1 had unexpectedly profound effects on human complement lysis. Changing the Leu235 to Glu abolished complement

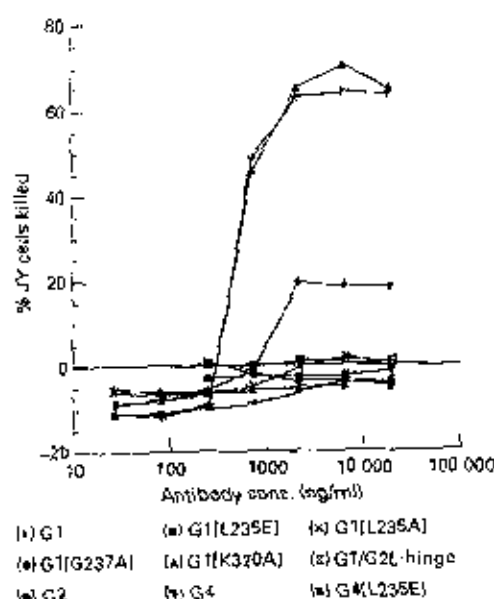


Figure 5. ADCC. Freshly isolated human serum was used as a source of complement, and lytic ability was measured using ^{51}Cr -labelled JY cells.

lysis (no killing at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ala at 235 permitted low levels of killing. In contrast, a change in the previously described C1q binding motif,¹² from Lys to Ala at 320, affected no change from the IgG1 wild-type killing (70% maximum cell killing and half the cells dead with 600 ng/ml).

Amino acid residues necessary for direct C1q binding

Direct binding of human C1q to the L243 human isotype series

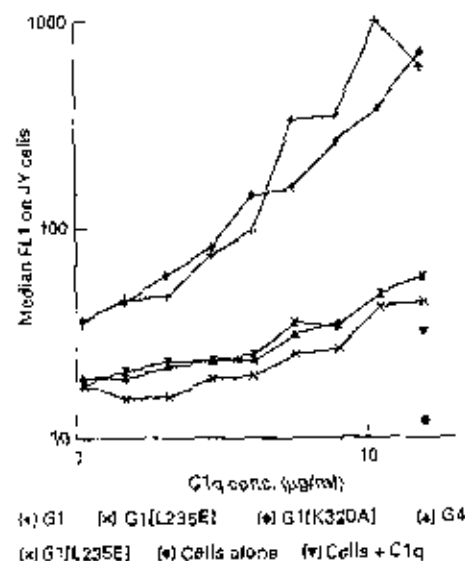


Figure 6. Direct binding of C1q. JY cells were coated with a saturating level of antibody. Binding of FITC-labelled human C1q (Sigma) was then revealed by FACS analysis.

© 1995 Blackwell Science Ltd, *Immunology*, 86, 319–324

confirmed the results with complement-mediated cytotoxicity (Fig. 6). Labelled human C1q bound well to wild-type IgG1, when bound to JV cells, and bound poorly to IgG4. Equilibrium dissociation constants were determined essentially as described by Krause *et al.*¹² and were 1.3×10^{-7} M and 1.5×10^{-6} M for IgG4 and IgG1, respectively. These values compare favourably with those obtained for the mouse antibodies IgG1 and IgG2a, which have similar functions.²¹ The Leu235 to Gln change in IgG1 reduced the binding of C1q to the same level as IgG4. In contrast, a change in the previously described C1q binding motif,¹² from Lys to Ala at 326, had no effect on C1q binding. The Leu235 to Gln change in IgG4 did not alter wild-type binding.

DISCUSSION

Using the anti-HLA-DR antibody L241 we have defined amino acids necessary for the Fc effector functions of human IgG1 using a matched set of engineered antibodies (summarized in Table 2).

We have demonstrated that amino acid residues necessary for FcγR1 binding of human IgG1 map to the N-terminal end of the C_H2 domain. Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 confirmed the importance of this sequence in IgG1 in that FcγR1 binding was abolished. Changing the Leu235 to Gln abolished FcγR1 binding and to Ala reduced it by 100-fold. Gly to Ala at 237 abolished FcγR1 binding. These observations are similar to those published using IgG3 and IgG4,^{3,4} with changes at 235 and 237 in the lower hinge/N-terminal C_H2 region markedly reducing FcγR1 binding. The similarities between the effect of point mutations in all three human IgG isotypes strongly suggest that they interact with FcγR1 in a similar way.

Our data indicating the importance of amino acid residues found in the C-terminal end of C_H2 for FcγR1 binding confirm data derived from using anti-hapten antibody systems¹⁻⁷ and have the clear advantage of being more physiological. Our isotype series recognizes a constitutive cell surface molecule, HLA-DR, which should be more similar to cell-bound antigen-antibody complexes *in vivo*.

Amino acid residues necessary for FcγR1 binding of human IgG1 also map to the C-terminal end of the C_H2 domain. Changing the Leu235 to Gln or Ala retained FcγR1-mediated function. Gly to Ala at 237 reduced FcγR1-mediated function. Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 further confirmed the importance of this sequence in IgG1 in that FcγR1-mediated function was reduced.

Changing residue 237 was similar to that of Murray *et al.*¹⁰ and Canfield & Morrison⁵ for contrast to Saravay *et al.*¹¹ using IgG3, and 235 of IgG1 had little effect on FcγR1. Together, these data suggest that IgG1 and FcγR1 in a slightly different way.

Using inter- and intradomain switch and IgG4, identified residues in IgG1 binding in the C-terminal half of the C_H2 into indicate that the residues they only ones necessary for FcγR1 high binding of human IgG1.

Amino acid residues necessary for

C1q binding of human IgG1 map to the N-terminal end of the C_H2 domain. Exchanging the whole lower hinge region with the sequence found in human IgG2 demonstrated the importance of this sequence in IgG1 in that complement lysis was abolished. Gly to Ala at 237 reduced complement lysis. Changing the Leu235 to Gln abolished human complement lysis. Duncan & Winter¹⁴ demonstrated that this change at 235 in mouse IgG2b had no effect on its high affinity for human C1q. In contrast, our change in their C1q binding motif, from Lys to Ala at 326 of IgG1, had no effect on complement lysis or C1q binding. This apparent contradiction is probably due to differences in C1q contacts between human IgG1 and mouse IgG2b.

We found that all the changes in the N-terminal end of the C_H2 domain reduced or abolished C1q binding and complement lysis. In contrast, Greenwood *et al.*¹³ found residues necessary for human complement lysis in the C-terminal half of the C_H2 domain. Tao *et al.*¹² also identified the C-terminal half of the C_H2 domain as necessary for complement lysis. They were able to separate C1q binding from complement-mediated lysis and found that IgG1 with a Pro to Ser change at 331, in the C-terminal half of the C_H2 domain, was able to bind human C1q as well as the wild type whilst being unable to activate complement. Clearly, both C1q binding and complement lysis require multipoint protein-protein interactions and will be dependent on many amino acid residues being the right size, shape and charge. The amino acids that we have identified within the N-terminal end of the C_H2 region may be necessary for C1q binding and the C-terminal residues for the binding and activation of the antibody-dependent complement cascade beyond C1q, all of these processes being necessary for successful activation of the complement cascade.

The observations described in this paper add to the growing body of knowledge of the structural basis of antibody Fc effector function, particularly in revealing that critical contact residues for FcγR and complement activation may differ amongst isotypes and species.

REFERENCES

1. BURNET D.R. & WILCOX J.M. (1952) Human antibody effector functions. *Adv Immunol* 5, 1.
2. LUCIANO VALIN Y.M. & LACHMANN P.J. (1991) The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin Exp Immunol* 84, 1.
3. WILSON J.M., FRANKLIN L.J., JEFFRIES R. & BURNET D.R. (1986) Localization of the monocyte-binding region on human immunoglobulin G. *Immunol Immunol* 23, 119.
4. LUND J., WILCOX G., JAMES P.T. *et al.* (1991) Human FcγR1 and FcγR2 interact with distinct but overlapping sites on human IgG. *J Immunol* 147, 2657.
5. CANFIELD S.M. & MORRISON S.L. (1991) The binding affinity of human IgG for its high affinity receptor is determined by multiple amino acids in the C_H2 domain and is modulated by the hinge region. *J Exp Med* 173, 1483.
6. CHAPMAN S.M., BENNAN D.E., EVERETT M., XU Y.Y., DUNNIBETH K.J. & KILLEN M.H. (1991) Identification of the Fc receptor class I binding site on human IgG through the use of recombinant IgG1/IgG2 hybrid and point mutated antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9936.
7. CHAPMAN S.M., BENNAN D.E., DUNNIBETH K., XU Y.Y. & KILLEN M.H.

- (1992) Identification of a secondary FcR1 binding site within a genetically engineered human IgG antibody. *J Biol Chem* **268**, 25124.
8. ALLEGRI M.-L., COLLINS A.M., PHILLIP V.L. *et al.* (1992) Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a 'humanised' OKT3 monoclonal antibody. *J Immunol* **148**, 3461.
9. KODAY E.A., WU T.T., YEWER H.M., GOTTESMAN K.S. & BODANSE C. (1991) In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (ed. Kabat), Vol. 2, 5th edn, p. 651. US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.
10. SARMAV G., LONO J., ROZKAYAN Z., GERDELY J. & JEFFERIS R. (1992) Mapping and comparison of the interaction sites on the Fc region of IgG responsible for triggering antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) through different types of human Fc receptors. *Molec Immunol* **29**, 633.
11. TAO M.H., CANNYELD S.M. & MORRISON S.L. (1991) The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the C1q domain. *J Exp Med* **173**, 1025.
12. TAO M.H., SMITH R.J.F. & MORRISON S.L. (1993) Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med* **178**, 661.
13. GREENWOOD J., CLARK M. & WALDMANN H. (1993) Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur J Immunol* **23**, 1098.
14. DUNCAN A.R. & WISNER G. (1988) The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 21.
15. LAMPSON L.A. & LEVY R. (1986) Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* **135**, 293.
16. WHITTLE P., ADAM J.R., LLOYD C. *et al.* (1987) Expression in COS cells of human/mouse chimeric B7-1 antibody. *Proc Eng* **1**, 499.
17. COCKEY M.J., BARNINGTON C.R. & YAMAMOTO G.T. (1991) The use of engineered E1A genes to transactivate the hCMV-MIE promoter in permanent CHO cell lines. *Nucleic Acids Res* **19**, 319.
18. COLETER D., MURPHY D., ROSELLI M. *et al.* (1989) Characterisation and biodistribution of recombinant and recombinant chimeric constructs of monoclonal antibody 872.3. *Cancer Res* **49**, 1738.
19. WOODIE E.S., THISTLETHWAITE J.R., JOLLOFF L.K. *et al.* (1992) Humanised OKT3 antibodies: successful transfer of immune modulating properties and idiotype expression. *J Immunol* **148**, 2756.
20. HUBSON L. & HAY F. C. (1980) Complement. In: *Practical Immunology*, 3rd edn, p. 268. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
21. LEATHERBARROW R.J. & DWER R.A. (1984) Binding of complement subcomponent C1q to mouse IgG1, IgG2a and IgG2b: a novel C1q binding assay. *Molec Immunol* **21**, 321.
22. KRAUSE D., SHEARMAN C., LANG W., KANZY E.J. & KURRLE R. (1990) Determination of affinities of murine and chimeric anti- $\alpha\beta$ -T-cell receptor antibodies by flow cytometry. *Belting Int Mitt* **87**, 56.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 October 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/113172 A3(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/EP2007/052928

(22) International Filing Date: 27 March 2007 (27.03.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/787,588 30 March 2006 (30.03.2006) US(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** (GB/GB); Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BURBIDGE, Stephen, Anthony** (GB/GB); GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue, Harlow Essex CM19 5AW (GB). **ELLIS, Jonathan, Henry** (GB/GB); GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **FORD, Susannah, E.** (GB/GB); GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **GERMASCHESKI, Volker** (DE/GB); GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). **KUMAR, Umesh** (GB/GB); GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue, Harlow Essex CM19 5AW (GB). **PHILPOTT, Karen, Louise** (GB/GB); GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue, Harlow Essex CM19 5AW (GB). **SODEN, Peter, Ernest** (GB/GB); GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park South, Third Avenue, Harlow Essex CM19 5AW (GB).(74) Agents: **VALENTINE, Jill, Barbara et al.**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 98Q Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(51) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, 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) 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, MT, 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).

Declarations under Rule 4.17:

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

Published:

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

(88) Date of publication of the international search report:
29 November 2007

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

(54) Title: **ANTIBODIES AGAINST AMYLOID-BETA PEPTIDE**(57) Abstract: Antibodies that bind human β -amyloid peptide, methods of treating diseases or disorders characterised by elevated β -amyloid levels or β -amyloid deposits with said antibodies, pharmaceutical compositions comprising said antibodies and methods of manufacture.

WO 2007/113172 A3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

PCT

see form PCT/ISA/220

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

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

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

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2007/052928

International filing date (day/month/year)
27.03.2007

Priority date (day/month/year)
30.03.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/18 A61P25/28 A61K39/395

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED

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

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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1b5(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

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

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

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

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office - P.O. Box 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Bumb, Peter

Telephone No. +31 70 340-8936



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/052928

Box No. 1 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:

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. 18 (with respect to industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 18 (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ 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.
- ☐ 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/EP2007/052928

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-20</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>8-10, 16, 20</u>
	No: Claims	<u>1-7, 11-15, 17-19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17, 19-20</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

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

see separate sheet

Re Item III

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

- 1.1 Claim 18 relates 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 this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

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

2. Prior Art

- 2.1 Reference is made to the following documents:

D1: WO 2004/080419 A (NEURALAB LTD; WYETH CORP [US]; BASI GURIQ [US]; SALDANHA JOSE W [GB];) 23 September 2004 (2004-09-23)

3. Novelty

- 3.1 An anti- β -amyloid antibody comprising the six CDRs as per claim 1 has not been reported. The subject-matter of claims 1-10, 16, 20 is novel (Article 33(2) PCT).
- 3.2 An anti- β -amyloid antibody binding $A\beta_{2-13}$ with a K_D which is 1000x greater than said antibody's K_D for $A\beta_{1-12}$ has not been reported. The subject-matter of claims 11-12 is novel (Article 33(2) PCT).
- 3.3 It follows that the subject-matter of claims 13-15, 17-19 must also be novel (Article 33(2) PCT).

4. Inventive Step

- 4.1 D1 is the closest prior art to the subject-matter of the claims and discloses one murine and two humanized versions of anti- $A\beta_{1-5}$ mAb 3D6 which bind $A\beta_{1-40}$ with an affinity of 880 pM (murine) or 2.06 nM, 2.24 nM (humanized) (see D1; Table 18, page 106). The epitope bound by said mAb 3D6-versions is sensitive to substitutions at position 1 which significantly reduce binding to said epitope (see D1; Residue 1; Table 17, pages 103-104) by a factor of ca. 10x. No information is given as to the K_D for $A\beta_{2-13}$ as such.
- 4.2 The subject-matter of claims 8-10 (humanized forms of 2E7), 16 (humanized forms of 2E7) and 20 (murine form of 2E7) differs from the mAbs of D1 (humanized/murine) in the particular structural features (amino acid sequences) of their complete antigen-binding regions VH + VL. The technical effect resulting from said differences is a K_D for $A\beta_{1-40}$ of 33.8-38.3 pM (murine 2E7), 92.2-95.0 pM (humanized H1L1), 49.8-58.1 pM (humanized H2L1) and 57.2-76.0 pM (humanized H3L1) (see present Table 10A), and no significant binding to $A\beta_{2-13}$ (see page 44, lines 18-22; page 28, lines 1-3).

The technical problem to be solved by the subject-matter of claims 8-10, 16 and 20 with respect to D1 may thus be seen as *the provision of antibodies which bind the extreme N-terminus (including residue 1) of $A\beta_{1-40}$ with increased affinity and increased selectivity.*

The technical problem has been solved by the concrete antigen-binding regions SEQ ID Nos: 26 + 32, 28 + 32, 30 + 32, 34 + 40, 36 + 40, 38 + 40 and 17 + 19. The person skilled in the art would not have been in a position to predict that improved affinity/specificity for a $A\beta_{1-40}$ epitope comprising residue 1 was achievable, nor could he have predicted the structural features which result in such improvement. The subject-matter of claims 8-10, 16 and 20 involves an inventive step (Article 33(3) PCT).

- 4.3 The affinity/specificity of a classical antibody is the direct result of the discrete three-dimensional structure of the antigen-binding region, which relies on the structural features of the combination of VH + VL regions, and three CDRs and four FR-regions per VH and VL.

- 4.4 It follows, that any antibody which does not comprise those structural features (i.e. FR-regions) which result in the desired affinity/specificity, i.e. those shown in the working embodiment SEQ ID Nos: 19 + 32, are missing essential technical features of the invention.

(i) Claims 1-4 do not technically define any donor FR-regions of the claimed antibody as the terms "originate" and "derived" encompass an unspecified number and unspecified type of modifications. The term "replaced by the donor antibody" (claim 4) does not define what said donor antibody is.

(ii) Claims 5-7 do not technically define more than one to three single amino acids within one FR region without defining any of the other seven FR-regions.

The subject-matter of claims 1-7 does not represent a complete technical solution in the sense of Article 33(3) PCT.

- 4.5 Furthermore, claims 1-7 encompass (for example, in addition to others) the concrete VL-FR4 according to SEQ ID NO: 24 which differs from the only working light VL-embodiment (SEQ ID NO: 32) in a G105Q substitution which has not been shown to solve the abovementioned technical problem of improved affinity.

Furthermore, claims 1-7 encompass four VH-FR regions "derived" or directly taken from VH3 gene family members (i.e. VH3-21, VH3-11, VH3-7, VH3-13, VH3-74, VH3-64, VH3-23, VH3-38, VH3-53, VH3-66, VH3-20, VH3-9, VH3-43) which have not been shown to solve the abovementioned technical problem of improved affinity (SEQ ID Nos 26/28/30 are "derived" from VH3-38).

The subject-matter of claims 1-7 is deemed speculative over at least some of the scope claimed and does not meet the requirements of Article 33(3) PCT.

- 4.6 The subject-matter of claims 11-12 differs from D1 in that the antibody is a different one. The alleged technical effect resulting from said difference is a ratio of $K_D(A\beta_{1-12}) : K_D(A\beta_{2-13})$ of 1000 : 1 (claims 11 & 12), a K_D for $A\beta_{1-12}$ of <100 pM and a K_D for $A\beta_{2-13}$ of <100 nM (claim 11) and a K_D for $A\beta_{1-40}$ of <10 nM (claim 12). The technical problem

to be solved is the provision of an anti-amyloid peptide antibody with such a ratio and such affinities.

The solution to the posed technical problem is entirely defined in terms of the desired properties of the claimed antibody without providing any type of technical information as to how such a desideratum is to be achieved. Hence, the subject-matter of claims 11-12 does not constitute a technical solution in the sense of Article 33(3) PCT.

- 4.7 Claims 13-15 & 17-19 only introduce technical features over the subject-matter of claims 1-7 & 11-12 which are routinely known in the art of therapeutic anti-amyloid β antibodies and thus do not provide any further essential technical features (Article 33(3) PCT).

5. Industrial Applicability

- 5.1 For the assessment of the present claims 18-19 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 6.1 The expressions "**originating** from.../**derived** from ..." (claims 1-3, 6) implies an unspecified number and type of modifications, encompasses the complete replacement of every amino acid residue with respect to the reference V-gene encoded polypeptides and thus does not confer any type of structural or technical information. The reader is left in doubt as to the technical features referred to (Article 6 PCT).
- 6.2 In claims 6 & 7 the applicant speaks of substitutions at positions 24, 48, **93 and 94**

33

within VH-regions (see claims 6 & 7: see pages 39, 6-7), but when one looks at the corresponding amino acid sequences (i.e. SEQ ID Nos: 26, 28, 30) one only sees substitutions at positions 24, 48, **97 and 98**. This inconsistency confuses the reader (Article 6 PCT).

- 6.3 The formulation "which **is** 1000-fold greater" (see claims 11-12) defines a **single** value $K_D (A\beta_{2-13}) = 1000 \times K_D (A\beta_{1-12})$, which seems to represent a highly **unlikely** result, thus raising doubts as to the reproducibility of such a $K_D (A\beta_{2-13}) : K_D (A\beta_{1-12})$ ratio (Article 6 PCT).
- 6.4 The following terms/expressions are unclear and leave the reader in doubt as to the technical features referred to (Article 6 PCT):
- "four residues fall within the CDR3 region is replaced" (claim 4) (grammatically unclear)
 - "substantially", "essentially" (claims 5, 14) (subjective terminology)
 - "antibody ... **derivative**" (claims 11 & 12) (in absence of any concrete structural features may encompass anything)
 - " β -amyloid peptide-related disease" (claims 18-19) (does not specify which of the β -amyloid peptides; does not specify in what way related)

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

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.	A1 01
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.	
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).	
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.	
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).	
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003	

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CERTENFREDE

ANTICUERPOS ANTICUERPOS CONTRA EL PEPTIDO AMILOIDE BETA

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al péptido β -amiloide y, en particular, al péptido β -amiloide humano. La presente invención también se refiere a métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una elevación de los niveles de β -amiloide o de los depósitos de β -amiloide, particularmente la enfermedad de Alzheimer, con dichos anticuerpos, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y a métodos para su fabricación. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes tras la descripción que se presenta más adelante.

Descripción

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común del deterioro cognitivo relacionado con la edad, que afecta a más de 12 millones de individuos en todo el mundo (Citron M (2002) Nat. Neurosci 5, Suppl 1055-1057). Las primeras fases de la enfermedad se caracterizan por una pérdida progresiva de memoria con un deterioro cognitivo asociado y déficits del lenguaje y del comportamiento. En las últimas fases de la enfermedad, los pacientes desarrollan amnesia global y tienen la función motora muy reducida. La muerte se produce típicamente 9 años después del diagnóstico y a menudo está asociada con otras afecciones, típicamente neumonía (Davis K.L. y Samuels S.C. (1998) en Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders eds Enna S.J. and Coyle J.T. (McGraw-Hill, New York, páginas 267-316)). Las terapias actuales son estrategias terapéuticas que se centran en el alivio del deterioro cognitivo y en la mejora de los síntomas conductuales asociados con la etiología de la enfermedad en progreso. En la práctica, estos tratamientos sólo proporcionan un efecto beneficioso sobre la cognición de corta duración, notificándose una duración del nivel de deterioro cognitivo conseguido de tan sólo hasta 2 años. El potencial de una terapia para modificar la enfermedad que ralentice y posiblemente detenga la progresión de la enfermedad es enorme. Estas estrategias proporcionarían mejoras radicales y sostenidas en la calidad de vida de los pacientes y en sus cuidadores, lo cual es muy importante, además de reducir los enormes costes sanitarios globales de esta enfermedad.

- El diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer se basa en una combinación de ensayos físicos y mentales que conducen al diagnóstico de una enfermedad de Alzheimer posible o probable. Después de la muerte, la enfermedad se confirma por
- 5 signos neurológicos caracterizados en el cerebro, que incluyen la deposición de A β en placas parenquimáticas y vasos cerebrales, la formación intraneuronal de ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y pérdida de subpoblaciones neuronales en regiones específicas del cerebro (Terry, RD (1991) J Neural Trans Suppl 53: 141-145).
- 10 Una gran cantidad de pruebas genéticas, histológicas y funcionales sugieren que el péptido β -amiloide (A β) es clave en la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, D. J. (2001) Physiological Reviews 81: 741-766).
- 15 Se sabe que A β se produce por medio de la escisión de la proteína precursora de beta amiloide (también conocida como APP) por una enzima aspartil proteasa conocida como BACE1 (también conocida como β -secretasa, Asp2 o Memapsin-2) (De Strooper, B. y Konig, G. (1999) Nature 402: 471-472). Se ha postulado que además de la deposición parenquimática y vascular, ciertas formas oligoméricas
- 20 solubles de A β contribuyen a la aparición de AD y pueden afectar a la función neuronal inicialmente perjudicando a la función sináptica (Lambert et. al. (1998) Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A. 95: 6448-6453). Aunque se encuentran placas amiloides insolubles en las primeras fases de AD y de MCI, en estos individuos también están aumentados los niveles de agregados de A β
- 25 soluble (que reciben el nombre de oligómeros o ligandos difundibles derivados de A β (ADDL) y los niveles de A β soluble se correlacionan mejor con la degeneración neurofibrilar y la pérdida de marcadores sinápticos que las placas de amiloide (Naslund et. al. (2000) J Am Med Assoc 283: 1571-1577, Younkin, S. (2001) Nat. Med. 1: 8-19). El A β 42 muy amiloidogénico y las formas truncadas en el extremo
- 30 amino A β x-42 son las especies predominantes de A β encontradas tanto en placas difusas como en placas seniles (Iwatsubo, T (1994) Neuron. 13:45-53, Gravina, SA (1995) J. Biol. Chem. 270:7013-7016). Los niveles relativos de A β 42 parecen ser el regulador clave de la agregación de A β en placas amiloides, de hecho se ha demostrado que A β 42 forma agregados más rápidamente que otras formas de A β

- in vitro (Jarrett, JT (1993) *Biochemistry*.32:4693-4697) y A β 42 como tal se ha implicado como molécula iniciadora en la patogénesis de la AD (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92:289-292). Aunque A β 42 es un producto minoritario del metabolismo de APP, los pequeños cambios en su producción están asociados con
- 5 grandes efectos sobre la deposición de A β , por lo tanto se ha postulado que la reducción de A β 42 solo puede ser una forma eficaz de tratar la AD (Younkin SG, (1998) *J. Physiol. (Paris)*. 92:289-292). Confirmando esta teoría, se ha notificado que ciertas mutaciones en los genes de la proteína precursora de amiloide (APP) y de la presenilina aumentan predominantemente los niveles relativos de A β 42 y, por
- 10 lo tanto, acortan el tiempo hasta la aparición de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Selkoe D.J., Podlisny M.B. (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:67-99). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la velocidad de deposición también depende del catabolismo y aclaramiento de A β .
- 15 Se han generado modelos animales de la deposición de amiloides por sobreexpresión de transgenes humanos mutantes en ratones. Los ratones que sobreexpresan transgenes de APP humanos individuales típicamente desarrollan depósitos de β -amiloide del tipo de placas cerebrales desde los 12 meses de edad (Games D. et al., (1995) *Nature* 373: 523-527; Hsiao K. et al., (1996) *Science* 274:
- 20 99-102)), mientras que los ratones que llevan transgenes tanto de APP humana mutante como de presenilina-1 (PS-1) típicamente desarrollan depósitos de β -amiloide del tipo de placas cerebrales ya a los 2 meses de edad (Kurt M.A. et al., (2001) *Exp.Neurol.* 171: 59-71; McGowan E. et al., (1999) *Neurolbiol. Dis.* 6: 231-244).
- 25 Se ha hecho cada vez más evidente que el transporte de A β exógeno entre el sistema nervioso central (SNC) y el plasma juega un papel en la regulación de los niveles de amiloide cerebrales (Shibata, et al (2000) *J Clin Invest* 106: 1489-1499), transportándose el A β del CSF (siglas en inglés de líquido cefalorraquídeo)
- 30 rápidamente desde el CSF hasta el plasma. Por lo tanto, tras la vacunación activa con péptidos A β o la administración pasiva de anticuerpos específicos contra A β , los anticuerpos se unen rápidamente al A β periférico alterando el equilibrio dinámico entre el plasma, el CSF y finalmente el SNC. De hecho, ahora hay una gran cantidad de estudios que han demostrado que estas dos estrategias pueden

reducir los niveles de A β , reducir la patología producida por A β y proporcionar beneficios cognitivos en diversos modelos transgénicos de amiloidosis. También se han realizado estudios limitados en especies superiores. Se inmunizaron monos verdes caribeños (de 16-10 años de edad) con péptido A β durante 10 meses. Los niveles de A β 40 se elevaron 2-5 veces en el plasma, alcanzando un máximo en 251 días, mientras que los niveles en el CSF de A β 40 y A β 42 se redujeron significativamente el 100 días y volvieron al nivel inicial posteriormente. Esta reducción en el CSF estuvo acompañada de una reducción significativa en la carga de placas (Lemere, CA (2004) Am J Pathology 165: 283-297). También se detectaron aumentos en los niveles plasmáticos de A β después de la inmunización de monos Rhesus de edad avanzada (de 15-20 años de edad) (Gandy, S (2004) Alzheimer Dis Assoc Disord 18: 44:46).

La primera terapia inmune dirigida a los amiloides cerebrales fue AN-1792 de Elan/Wyeth, una vacuna activa. Este tratamiento se terminó después del desarrollo de signos clínicos coherentes con una meningoencefalitis. Los análisis de subgrupos sugirieron que el tratamiento ralentizaba el deterioro de la función cognitiva (Nature Clin Pract Neurol (2005) 1:84-85). El análisis post-mortem de los pacientes también mostró pruebas de eliminación de placas (Gilman S. et al, (2005) Neurology 64 (9) 1553-1562). Se ha demostrado que Bapineuzumab (AAB-001, Elan/Wyeth), una terapia pasiva de MAb, mejora significativamente las puntuaciones de cognición en un pequeño estudio de seguridad de fase I.

Otras enfermedades o trastornos caracterizados por una elevación de los niveles de β -amiloide o los depósitos de β -amiloide incluyen el deterioro cognitivo leve (MCI), Blasko I (2006) Neurobiology of aging "Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine" en prensa, e-publicado el 19 de octubre de 2006), la hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis de tipo Dutch, la angiopatía β -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias degenerativas tales como las asociadas con la enfermedad de Parkinson, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración basal cortical y la enfermedad de Alzheimer del tipo cuerpos de Lewy difusos (Mollenhauer B (2007) J Neural Transm

e-publicado el 23 de febrero de 2007, van Oijen, M Lancet Neurol. 2006 5:655-60) y síndrome de Down (Mehta, PD (2007) J Neurol Sci. 254:22-7).

Compendio de la Invención

- 5 En una realización de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-12 (SEC ID N°: 15) con una constante de equilibrio KD menor de 100 pM pero no se une al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44), realizándose las dos determinaciones en un ensayo de resonancia de
10 plasmón superficial utilizando el péptido capturado en un chip con estreptavidina.

- En otra realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-12 (SEC ID N°: 15) con una constante de
15 equilibrio KD menor de 100 pM y que tiene una constante de equilibrio KD para la unión al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44) que es 1000 veces mayor que la constante de unión para el péptido 1-12 (SEC ID N°: 15), realizándose las dos determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando el
20 péptido capturado sobre un chip con estreptavidina.

- En otra realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-12 (SEC ID N°: 15) con una constante de
equilibrio KD menor de 100 pM y que tiene una constante de equilibrio KD para la
25 unión al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44) que es 10.000 veces mayor que la constante de unión para el péptido 1-12 (SEC ID N°: 15), realizándose las dos determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando el
péptido capturado sobre un chip con estreptavidina.

- 30 En un aspecto, el ensayo de resonancia de plasmón superficial que utiliza el péptido capturado sobre un chip de estreptavidina es el ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial descrito en el ejemplo presentado más adelante. En otro aspecto, el ensayo de resonancia de plasmón superficial que utiliza el péptido

capturado sobre un chip de estreptavidina es el Método A(i) descrito bajo el análisis SPR Biacore™ presentado a más adelante.

5 En una realización alternativa de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-40 con una constante de equilibrio KD menor de 10 nM pero no se une al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44), realizándose las dos determinaciones en un ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Método B de los ejemplos presentados más adelante.

15 En otra realización alternativa de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-40 con una constante de equilibrio KD menor de 10 nM y que tiene una constante de equilibrio KD para la unión al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44) que es 1000 veces mayor que la constante de equilibrio para el péptido 1-12 (SEC ID N°: 15), realizándose las dos determinaciones en el ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Método B de los ejemplos proporcionados más adelante.

20 En otra realización alternativa de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide 1-40 con una constante de equilibrio KD menor de 10 nM y que tiene una constante de equilibrio KD para la unión al péptido β -amiloide 2-13 (SEC ID N°: 44) que es 10.000 veces mayor que la constante de equilibrio para el péptido 1-12 (SEC ID N°: 15), realizándose las dos determinaciones en el ensayo de resonancia de plasmón superficial descrito en el Método B de los ejemplos proporcionados más adelante.

30 En una realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y/o derivado del mismo que se une al péptido β -amiloide y que comprende las siguientes CDR:

CDRH1: DNGMA (SEC ID N°: 1)

CDRH2: FISNLAYSIDYADTVTG (SEC ID N°: 2)

CDRH3: GTWFAY (SEC ID N°: 3)

dentro de una región variable de cadena pesada humana procedente de la familia génica VH3 y:

5 CDR1: RVSQSLHSNGYTYLH (SEC ID N°: 4)

CDRL2: KVSNRFS (SEC ID N°: 5)

CDRL3: SQTRHVPYT (SEC ID N°: 6)

dentro de una región variable de cadena ligera humana procedente de la secuencia de aminoácidos descrita en GenPept con la entrada CAA51135 (SEC ID N°: 24).

10

A lo largo de esta memoria descriptiva, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2" y "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat indicado en Kabat *et al*; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. Por lo tanto, lo siguiente define las CDR de acuerdo con la invención:

15 **CDR: Restos**

CDRH1: 31-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

CDRL1: 24-34

20 CDR2: 50-56

CDRL3: 89-97

La familia génica VH3 y la nomenclatura de genes de inmunoglobulina relacionados se describe en Matsuda *et al* (*Journal of Experimental Medicine*, 188:2151-2162, 1998) y Lefranc & Lefranc (*The Immunoglobulin Factsbook*. 2001. Academic Press: London).

25

En una realización particular, la región variable de cadena pesada humana procede de:

30

- Un gen V seleccionado entre la siguiente subserie de miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21, VH3-11, VH3-7, VH3-13, VH3-74, VH3-64, VH3-23, VH3-38, VH3-53, VH3-66, VH3-20, VH3-9 y VH3-43
- Un gen V seleccionado entre la siguiente subserie de miembros de la familia VH3: VH3-48, VH3-21 & VH3-11

- ♦ El gen VH3-48
o un alelo del mismo.

La secuencia en el Genbank con la entrada M99675 es un alelo del gen VH3-48.
5 M99675 es una secuencia de nucleótidos del Genbank de una pieza genómica de
ADN que incluye dos exones que constituyen el gen de cadena pesada humana
VH3-48 (SEC ID N°: 22) y codifica la secuencia de aminoácidos de la región
variable proporcionada en la SEC ID N°: 21. En un aspecto particular, la región de
marco de la cadena pesada aceptora humana procede de M99675.

10

Para construir una región V completa, tiene que añadirse una región de marco 4 al
gen de V M99675 codificado en la línea germinal. Las secuencias de la región de
marco 4 adecuadas incluyen las codificadas por el minigen JH4 humano (Kabat):

YFDYWGGGTLTVSS (SEC ID N°: 23)

15 cuyos cuatro restos iniciales están dentro de la región CDR3 que se reemplaza por
la CDR entrante procedente del anticuerpo donador.

El especialista en la técnica apreciará que un gen V de la línea germinal y un gen J
no incluyen la secuencia codificante de la totalidad de la CDR3 de cadena pesada.
20 Sin embargo, en los anticuerpos de la invención, la secuencia de CDR3 se
proporciona por la inmunoglobulina donadora. Por consiguiente, la combinación de
un gen VH tal como VH3-48, un minigen JH tal como JH4, y una serie de CDR de
cadena pesada, tales como la SEC ID N°: 1, la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 3
(ensambladas de una manera para imitar a una región variable de cadena pesada
25 totalmente reorganizada, madura) es suficiente para definir una región variable de
cadena pesada de la invención tal como la representada en las SEC ID N°: 26, 28,
30.

La región variable codificada por Genpept ID CAA51134 tiene la secuencia de
30 aminoácidos proporcionada en la SEC ID N°: 24.

La secuencia de marco de la región variable de cadena ligera conocida por el
GenPept ID CAA51134 es la secuencia de aminoácidos deducida de una región
variable de cadena ligera totalmente reorganizada y es idéntica a otra secuencia de

46

46

aminoácidos con las mismas regiones de marcos en la base de datos: Genpept, número de acceso: S40356, y se describe en Klein, R., et al., Eur. J. Immunol. 23 (12), 3248-3262 (1993). La secuencia codificante de ADN para CAA51134, a la que se puede acceder con el N° de acceso X72467 del Genbank, se proporciona como

5 SEC ID N°: 25.

En un aspecto particular de la invención, la región de marco de cadena pesada aceptora humana procede de M99675 y el minigen JH4 y la región de marco de cadena ligera aceptora humana procede de CAA51135, que contiene
10 opcionalmente una o más, tal como de una a cuatro, más particularmente de una a tres, sustituciones de restos aminoacídicos basándose en los restos correspondientes encontrados en el dominio V_H donador que tiene la secuencia: SEC ID N°: 17 y el dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N°: 19 que mantiene
15 toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo donador para el péptido β -amiloide.

Por 'sustancialmente toda la afinidad de unión' se entiende que el anticuerpo terapéutico tiene, como máximo, una reducción de diez veces en la afinidad de
20 unión en comparación con el anticuerpo donador.

En un aspecto más particular, la región de marco de cadena pesada aceptora humana procedente de M99675 y JH4 tiene de una a cuatro sustituciones de restos aminoacídicos seleccionadas entre las posiciones 24, 48, 93 y/o 94 (numeración de Kabat).

25 En un aspecto más particular de la invención, la región de marco de cadena pesada aceptora humana derivada de M99675 y JH4 comprende los siguientes restos (o un sustituto conservativo de los mismos):

(I)

30	Posición	Resto
	93	V
	94	S

o

(ii)

	Posición	Resto
	24	V
	93	V
5	94	S

o

(iii)

	Posición	Resto
10	48	I
	93	V
	94	S

En una realización de la invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia indicada en las SEC ID N°: 26, 28 ó 30 y un dominio V_L que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 32.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 34, 36 ó 38 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 40.

En otra realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

En otra realización de la invención, se proporciona un método para tratar a un paciente humano que padece una enfermedad relacionada con el péptido β -amiloide, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención.

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

En otra realización de la invención, se proporciona un proceso para la fabricación de un anticuerpo terapéutico de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho proceso expresar un polinucleótido que codifica el anticuerpo en una célula hospedadora.

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 26, 28 ó 30.

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico que comprende un dominio V_L que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 32.

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica a una cadena pesada de anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 34, 36 ó 38.

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°: 40.

En una realización más particular de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo terapéutico, comprendiendo dicho polinucleótido la secuencia indicada en la SEC ID N°: 35, 37, 39 ó 42.

En otra realización más particular de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo terapéutico, comprendiendo dicho polinucleótido la secuencia indicada en la SEC ID N°: 41 ó 43.

En una realización particular, el anticuerpo terapéutico que es un anticuerpo o fragmento y/o derivado del mismo esencialmente carece de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N°: 17 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N°: 19.

5

En otra realización de la invención, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia SEC ID N°: 17, en particular el polinucleótido de la SEC ID N°: 18.

10

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

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Estructuras de Anticuerpo

1.1 Anticuerpos Intactos

- 20 Los anticuerpos intactos normalmente son glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Aparte de IgM, los anticuerpos intactos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 KDa, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un
- 25 enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene enlaces disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varias regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y una región
- 30 constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos denominados Kappa y Lambda basándose en

- la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA pueden subdividirse adicionalmente en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especie, teniendo el ratón y la rata al menos IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al antígeno, representando ciertas regiones una variabilidad particular y denominándose regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las partes más conservadas de la región variable se denominan regiones de marcos (FR).
- 5 Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera intactas comprende cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas por las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación de los sitios de unión a antígenos de los anticuerpos. Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras tales como la participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, la vida media/velocidad de aclaramiento a través del receptor neonatal de Fc (FcRn) y la citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento. La región constante de IgG2 humana carece de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica o de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La región constante de IgG4 carece de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica y media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo sólo débilmente. Los anticuerpos que carecen esencialmente de estas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos "no líticos".
- 10
15
20
25

1.1.1 Anticuerpos humanos

- Los anticuerpos humanos pueden producirse por varios métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por el método de hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o heteromieloma de ratón-humano, véase Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, página 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los métodos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos utilizando en ambos casos repertorios de regiones
- 30

V humanas (véase Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J.Immunol.methods 231, 11-23).

Actualmente se dispone de varias cepas de ratones transgénicos donde su loci de
5 inmunoglobulina de ratón se han reemplazado con segmentos de genes de
inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild
D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics,
15,146-156). Tras la exposición a antígenos, estos ratones pueden producir un
repertorio de anticuerpos humanos a partir de los cuales pueden seleccionarse los
10 anticuerpos de interés.

Debe indicarse particularmente el sistema Trimer[™] (véase Eren R et al, (1998)
Immunology 93:154-161) en el que se trasplantan linfocitos humanos en ratones
irradiados, el Sistema de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados (SLAM, véase
15 Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848) en el que se pasan eficazmente
linfocitos humanos (o de otras especies) a través de un procedimiento de
generación masiva de anticuerpos reunidos *in vitro* seguido de un procedimiento
simplificado de dilución limitante y selección y el Xenomouse II[™] (Abgenix Inc). En
Morphotek Inc está disponible una estrategia alternativa que usa la tecnología
20 Morphodoma[™].

La tecnología de presentación de fagos puede usarse para producir anticuerpos
humanos (y fragmentos de los mismos), véase McCafferty; Nature, 348, 552-553
(1990) y Griffiths AD et al (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo con esta
25 técnica, se clonan genes del dominio V de anticuerpos en fase en un gen de la
proteína principal o minoritaria de la cubierta de un bacteriófago filamentoso, tal
como M13 o fd, se presentan (normalmente con la ayuda de un fago coadyuvante)
como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del
fago. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo tienen
30 como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas
propiedades. La técnica de presentación en fagos puede usarse para seleccionar
anticuerpos con especificidad de antígeno a partir de bibliotecas realizadas a partir
de células B humanas tomadas de individuos que padecen una enfermedad o
trastorno descrito anteriormente o, como alternativa, a partir de donantes humanos

2
53

no inmunizados (véase Marks; J.Mol.Bio. 222,581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprende un dominio Fc, es necesario volver a clonar el fragmento derivado presentado en el fago en un vector de expresión de mamífero que comprende las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estable.

Puede usarse la técnica de maduración por afinidad (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) para mejorar la afinidad de unión, donde la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora reemplazando secuencialmente las regiones V de cadena H y L por variantes naturales y seleccionando basándose en las afinidades de unión mejoradas. Ahora también se dispone de variantes de esta técnica tales como "impronta de epítopo", véase WO 93/06213. Véase también Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

15 1.2 Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos lleva asociados los nuevos problemas bien establecidos de inmunogenicidad potencial, especialmente tras la administración repetida del anticuerpo, es decir, el sistema inmune del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como extraño y crear una respuesta neutralizadora. Además de desarrollar anticuerpos totalmente humanos (véase anteriormente), se han creado varias técnicas a lo largo de los años para solucionar estos problemas y generalmente implican la reducción de la composición de secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico intacto mientras se retiene una facilidad relativa para obtener anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado por ejemplo, un ratón, rata o conejo. En general, se han usado dos estrategias para conseguir esto. La primera son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor, tal como ratón) fusionado a una región constante humana. Como el sitio de unión a antígenos de un anticuerpo está localizado dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico retiene su afinidad de unión por el antígeno, pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por lo tanto, puede realizar funciones efectoras tales como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando métodos de ADN recombinante. Se

53

aísla el ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las regiones variables de cadena H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo, ADN de las SEC.I.D.Nº 18 y 20 descritas anteriormente). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de este ADN. Una vez aislado, el ADN se pone en vectores de expresión que después se utilizan para transfectar células hospedadoras tales como *E. coli*, células COS, células CHO, células PerC6 o células de mieloma que no producen de otra forma inmunoglobulinas, para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo las regiones constantes H y L no humanas (murinas) por la secuencia codificante de las cadenas L y H humanas correspondientes, véase, por ejemplo, Morrison; PNAS 81, 6851 (1984). De esta manera, en otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID Nº: 17 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID Nº: 19 fusionados a una región constante humana (que puede ser de isotipo IgG, por ejemplo, IgG1).

La segunda estrategia implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se ha reducido humanizando las regiones variables. Han conseguido popularidad dos técnicas para la humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR forman bucles próximos al extremo N del anticuerpo, donde forman una superficie montada en un soporte proporcionado por las regiones de marcos. La especificidad de unión a antígenos del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie de CDR. Estas características a su vez se determinan por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los restos que constituyen las CDR. Puede conseguirse una gran disminución de la inmunogenicidad injertando sólo las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) (anticuerpos "donadores") en regiones de marcos ("región de marco aceptora") y contantes humanas adecuadas (véase Jones *et al* (1986) Nature 321,522-525 y Verhoyen M *et al* (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR *per se* puede no producir la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y a menudo se observa que es necesario conservar algunos

- restos de marcos del anticuerpo donador (lo cual recibe el nombre en algunas ocasiones de "retromutaciones") en la molécula humanizada si se desea recuperar una afinidad de unión al antígeno significativa (véase Queen C *et al* (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co. M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, las
- 5 regiones V humanas que muestran la mayor homología de secuencia (típicamente de 60% o mayor) con el anticuerpo donador no humano pueden elegirse de una base de datos para proporcionar la región de marco (FR) humana. La selección de FR humanas puede realizarse a partir de anticuerpos humanos individuales o anticuerpos consenso humanos. Cuando sea necesario, en la región de marco
- 10 aceptora humana se ponen como sustituyentes los restos clave del anticuerpo donador para conservar las conformaciones de CDR. Puede usarse la creación de modelos del anticuerpo por ordenador para ayudar a identificar estos restos estructuralmente importantes, véase el documento WO99/48523.
- 15 Como alternativa, la humanización puede conseguirse por un proceso de "modificación superficial" ("veneering"). Un análisis estadístico de regiones variables características de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina revelaron que los patrones precisos de restos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones superficiales
- 20 individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan E.A. *et al*; (1991) Mol.Immunol.28, 489-498 y Pedersen J.T. *et al* (1994) J.Mol.Biol. 235; 959-973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando restos expuestos en sus regiones de marcos que difieren de los que se encuentran normalmente en los
- 25 anticuerpos humanos. Como la antigenicidad de las proteínas puede correlacionarse con la accesibilidad de la superficie, el reemplazo de restos de la superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable de ratón sea "invisible" al sistema inmune humano (véase también Mark G.E. *et al* (1994) en
- 30 *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113; The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "modificación superficial" porque sólo se altera la superficie del anticuerpo, los restos de soporte permanecen sin cambios. Otras estrategias alternativas incluyen la indicada en el documento WO04/006955 y el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios) que hace uso de sistemas de

expresión bacterianos y produce anticuerpos próximos a la línea germinal humana en secuencia (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics enero de 2007, San Diego, California).

- 5 Los especialistas en la técnica apreciarán que el término "derivado" pretende definir no sólo la fuente en el sentido de ser el origen físico para el material, sino también definir un material que es estructuralmente idéntico al material pero que no procede de la fuente de referencia. De esta manera, los "restos encontrados en el anticuerpo donador" no necesitan haberse purificado obligatoriamente a partir del
- 10 anticuerpo donador.

- En la técnica está bien reconocido que ciertas sustituciones de aminoácidos se consideran "conservativas". Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral y las sustituciones dentro de grupos
- 15 que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo terapéutico de la invención se consideran sustituciones conservativas, véase la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

<u>Cadena lateral</u>	<u>Miembros</u>
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
restos que afectan a la orientación de la cadena	gly, pro
Aromática	trp, tyr, phe

20 **1.3 Anticuerpos biespecíficos**

- Un anticuerpo biespecífico es un derivado de anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes y también forma parte de la invención. Los métodos de fabricación de estos anticuerpos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos
- 25 se basa en la coexpresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulina, donde las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véase Millstein

et al, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 y Traunecker *et al* EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales sólo una tiene la especificidad de unión deseada. Una estrategia alternativa implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseadas para la región constante de cadena pesada que comprende al menos parte de la región de bisagra, y las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones, y si se desea la cadena L, se insertan en vectores de expresión distintos y después se utilizan para contranfectar un organismo hospedador adecuado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En una estrategia preferida, el anticuerpo biespecífico se compone de una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadenas H-L, que proporcionan una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO94/04690. Véase también Suresh *et al* Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

La administración de proteínas terapéuticas en el cerebro se ha visto obstaculizada por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB). Cuando se desea administrar un anticuerpo de la invención o un fragmento de anticuerpo de la invención a través de la BBB, se han propuesto varias estrategias para mejorar dicha administración en caso necesario.

Para obtener los nutrientes y factores necesarios a partir de la sangre, la BBB posee algunos receptores específicos que transportan compuestos desde la sangre circulante al cerebro. Ciertos estudios han indicado que algunos compuestos tales como la insulina (véase Duffy KR *et al* (1989) Brain Res. 420:32-38), la transferrina (véase Fishman JB *et al* (1987) J.Neurosci 18:299-304) y los factores de crecimiento semejantes a la insulina 1 y 2 (véase Pardridge WM (1986) Endocrine Rev.7:314-330 and Duffy KR *et al* (1986) Metabolism 37:136-140) atraviesan la BBB por medio de transcitosis mediada por receptor. De esta manera, los receptores para estas moléculas proporcionan un medio potencial para que los anticuerpos de la invención accedan al cerebro usando los denominados

anticuerpos "vectorizados" (véase Pardridge WM (1999) *Advanced Drug Delivery Review* 36:299-321). Por ejemplo, se ha demostrado que un anticuerpo contra el receptor de transferrina se transporta dinámicamente al parénquima cerebral (véase Friden PM *et al* (1991) *PNAS* 88:4771-4775 y Friden PM *et al* (1993) *Science* 259:373-377). De esta manera, una estrategia potencial es producir un anticuerpo específico o un fragmento biespecífico tal como se ha descrito anteriormente, donde una primera especificidad es hacia ... y una segunda especificidad es hacia un receptor de transporte localizado en la BBB, por ejemplo, una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de transferrina.

10

1.4 Fragmentos de Anticuerpos

En ciertas realizaciones de la invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un fragmento de unión a antígenos. Estos fragmentos pueden ser fragmentos de unión a antígenos funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos anteriormente. Los fragmentos que carecen de la región constante carecen de la capacidad de activar el complemento por la ruta clásica o mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, por ejemplo, por digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células hospedadoras transformadas de manera recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird *et al* (1988) *Science*, 242, 423-426. Además, pueden producirse fragmentos de anticuerpo usando una diversidad de técnicas de ingeniería como las descritas más adelante.

25

Los fragmentos Fv parecen tener menos energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para establecer la asociación de los dominios V_H y V_L, se han asociado con péptidos (Bird *et al*, (1988) *Science* 242, 423-426, Huston *et al*, *PNAS*, 85, 5879-5883), enlaces disulfuro (Glockshuber *et al*, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367) y mutaciones de acoplamiento ("knob in hole") (Zhu *et al* (1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788). Los fragmentos ScFv pueden producirse por métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, véase Whittlow *et al* (1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 y Huston *et al* (1993) *Int.Rev.Immunol* 10,

30

- 195-217. Los fragmentos ScFv pueden producirse en células bacterianas tales como *E. coli*, pero más típicamente se producen en células eucariotas. Un inconveniente de ScFv es la monovalencia del producto, que impide el aumento de avidéz debido a la unión polivalente, y su corta vida media. Los intentos de
- 5 solucionar estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalente producido a partir de ScFv que contiene una cisteína C-terminal adicional por acoplamiento químico (Adams *et al* (1993) *Can.Res* 53, 4026-4034 y McCartney *et al* (1995) *Protein Eng.* 8, 301-314) o por dimerización espontánea con especificidad de sitio de ScFv que contiene un
- 10 resto de cisteína C-terminal no emparejado (véase Kipriyanov *et al* (1995) *Cell. Biophys* 26, 187-204). Como alternativa, puede forzarse a ScFv a formar multímeros por acortamiento del enlazador peptídico a una longitud comprendida entre 3 y 12 restos para formar "diacuerpos", véase Holliger *et al* *PNAS* (1993), 90, 6444-6448. La reducción del enlazador adicionalmente puede producir trímeros de
- 15 ScFv ("triacuerpos", véase Kortt *et al* (1997) *Protein Eng.* 10, 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall *et al* (1999) *FEBS Lett.* 453, 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también puede conseguirse por fusión genética con motivos de dimerización de proteínas para formar "minianticuerpos" (véase Pack *et al* (1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584) y
- 20 "minicuerpos" (véase Hu *et al* (1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061). También pueden producirse tandems ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) uniendo dos unidades de ScFv por un tercer enlazador peptídico, véase Kurucz *et al* (1995) *J.Immol.* 154, 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos pueden producirse por medio de la asociación no covalente de dos productos de fusión monocatenarios que consisten en un
- 25 dominio V_H de un anticuerpo conectado por un enlazador corto al dominio V_L de otro anticuerpo, véase Kipriyanov *et al* (1998), *Int.J.Can* 77,763-772. La estabilidad de estos diacuerpos biespecíficos puede mejorarse por medio de la introducción de enlaces disulfuro o mutaciones de acoplamiento ("knob in hole") como se ha descrito anteriormente o por la formación de diacuerpos monocatenarios (ScDb) donde dos fragmentos de ScFv híbridos se conectan a través de un enlazador
- 30 peptídico, véase Kontermann *et al* (1999) *J.Immunol.Methods* 226 179-188. Se dispone de moléculas tetravalentes biespecíficas, por ejemplo, fusionando un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula de IgG o a un fragmento Fab a través de la región de bisagra, véase Coloma *et al* (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163. Como alternativa, se han creado moléculas tetravalentes biespecíficas por

la fusión de diacuerpos monocatenarios biespecíficos (véase Alt *et al*, (1999) FEBS Lett 454, 90-94). También pueden formarse moléculas biespecíficas tetravalentes por la dimerización de tandems ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller *et al* (1998) FEBS Lett 432, 45-49) o una molécula monocatenaria que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que previene el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tandem, véase Kipriyanov *et al*, (1999) J.Mol.Biol. 293, 41-56). Los fragmentos $F(ab')_2$ biespecíficos pueden crearse por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby *et al*, (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225 y Kostelny *et al* (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553). También se dispone de dominios aislados de V_H y V_L , véanse los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; y US 6.172.197.

15 1.5 Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados son derivados que también constituyen una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente formados usando cualquier método de reticulación conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

20

1.6 Otras Modificaciones.

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores de Fc ($Fc\gamma R$) media las funciones efectoras del anticuerpo, que incluyen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fijación del complemento, la fagocitosis y la vida media /aclaramiento del anticuerpo. Pueden realizarse diversas modificaciones en la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la función efectora deseada. En particular, las regiones constantes humanas que carecen esencialmente de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, incluyen la región constante de IgG4, la región constante de IgG2 y regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas tales como, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y/o 322 descritas en los documentos EP0307434 (WO8807089), EP 0629 240 (WO9317105) y WO 2004/014953. Se han descrito por separado

30

mutaciones en los restos 235 ó 237 dentro del dominio CH2 de la región constante de cadena pesada (numeración de Kabat; sistema EU Index) para reducir la unión a FcγRI, FcγRII y FcγRIII y, por lo tanto, reducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Duncan et al. Nature 1988, 332; 563-564; Lund et al. J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappel et al. PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton y Woof, Adv. Immunol. 1992, 51;1-84; Morgan et al., Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Además, algunos informes también han descrito la implicación de algunos de estos restos en el reclutamiento o mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Morgan et al., 1995; Xu et al., Cell. Immunol. 2000; 200:16-26; Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Por lo tanto, los restos 235 y 237 se han mutado a restos de alanina (Brett et al. Immunology 1997, 91; 346-353; Bartholomew et al. Immunology 1995, 85; 41-48; y documento WO9958679) para reducir tanto los efectos mediados por el complemento como los efectos mediados por FcγR. Los anticuerpos que comprenden estas regiones constantes pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

Se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación en el anticuerpo para aumentar la vida media en suero, véase el documento US 5.739.277.

Actualmente hay cinco receptores Fcγ humanos reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields et al, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 demostraron que una serie común de restos de IgG1 está implicada en la unión a todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de esta serie común. Un grupo de restos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγR cuando se cambiaron por alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y están agrupados cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza sólo la serie común de restos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII Interaccionan con restos distintos además de la serie común. La alteración de algunos restos sólo redujo la unión a FcγRII (por ejemplo Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII, pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoraron la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII no se vio afectada).

- Otras variantes presentaron mejor unión a FcγRII o FcγRIII con reducción en la unión a los otros receptores (por ejemplo, Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). En el caso de FcγRIIIa, las mejores variantes de unión de IgG1 tenían sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334.
- 5 Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado en la protección de moléculas de IgG de la degradación y, de esta manera, en el aumento de la vida media en suero y la transcitosis a través de tejidos (véase Junghans R.P (1997) Immunol.Res 16, 29-57 y Ghetie *et al* (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Los restos de IgG1 humana que según se ha determinado interaccionan directamente con FcRn
- 10 humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435.

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

- 15 En una realización particular, el anticuerpo terapéutico carece esencialmente de las funciones de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. En una realización más particular, la presente invención proporciona anticuerpos terapéuticos de la invención que tienen uno (o más) de los cambios de restos indicados con detalle anteriormente para
- 20 modificar la vida media/aclaramiento y/o funciones efectoras tales como ADCC y/o citotoxicidad dependiente del complemento y/o lisis del complemento.

- En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo terapéutico tiene una región constante de IgG1 de isotipo humano con sustituciones de alanina (u otras
- 25 alteraciones) en las posiciones 235 (por ejemplo, L235A) y 237 (por ejemplo, G237A) (numeración de acuerdo con el esquema EU indicado en Kabat.

- Otros derivados de la invención incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención. Se sabe que la glicosilación de anticuerpos en
- 30 posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un profundo efecto sobre la función de los anticuerpos, particularmente las funciones efectoras tales como las descritas anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd *et al* (1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos de la presente invención en las que se añaden, sustituyen, delecionan

- o modifican uno o más restos de carbohidrato. La introducción de un motivo de asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de restos de carbohidrato y, por lo tanto, puede usarse para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju *et al* (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876, la
- 5 sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se aumentó a través de un proceso de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alta-2,3-sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialilación terminal aumenta la vida media de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, de la misma manera que la mayoría de las glicoproteínas, típicamente se producen en la naturaleza
- 10 como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente de mamífero. Se han creado varios métodos para fabricar glicoformas definidas, véase Zhang *et al* *Science* (2004), 303, 371, Sears *et al*, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker *et al* (2002) *Science*, 298 1790, Davis *et al* (2002) *Chem.Rev.* 102, 579, Hang *et al*
- 15 (2001) *Acc.Chem.Res* 34, 727. De esta manera, la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (que pueden ser de isotipo de IgG, por ejemplo IgG1) como se describen en este documento que comprenden un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o una sola) de glicoforma de dichos anticuerpos.
- 20 Los derivados de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención acoplados a un polímero no proteico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la vida media de las
- 25 proteínas, así como para reducir la antigenicidad y la inmunogenicidad de las proteínas. Se ha investigado el uso de la PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. *et al* (2000) *Int.J.Pharmaceut.* 198:83-95. Una realización particular comprende un fragmento de unión a antígeno de la
- 30 invención sin las funciones efectoras de a) activación del complemento por la ruta clásica; y b) mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo; (tal como un fragmento Fab o un scFv) acoplado a PEG.

2. Métodos de Producción

- Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock *et al* (1999), J.Immunol.Methods 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1-55), ratones (véase Pollock *et al* *ibid*) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*, (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). También pueden producirse anticuerpos por síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención se producen típicamente usando la tecnología de cultivo de células recombinantes bien conocida para los especialistas en la técnica. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para la propagación adicional o expresión en una célula hospedadora. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el vendido por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula hospedadora es CHO o NS0 (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, y minicromosomas, siendo una realización típica los plásmidos. Generalmente, estos vectores incluyen además una secuencia señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas ligera y pesada puede insertarse en vectores separados e introducirse (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedadora al mismo tiempo o secuencialmente o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.
- Inmediatamente será evidente para los especialistas en la técnica que debido a la redundancia del código genético, también están disponibles polinucleótidos alternativos a los descritos en este documento que codifican los polipéptidos de la invención.

2.1 Secuencias señal

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia señal debe reconocerse y procesarse por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariontes, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinasa o secuencias líder de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, las secuencias señal pueden ser un líder de invertasa de levadura, el líder del factor α o líderes de fosfatasa ácida, véase, por ejemplo, el documento WO90/13646. En sistemas celulares de mamífero, se dispone de líderes de secreción virales tales como la secuencia señal de gD del virus herpes simplex y secuencias señal de inmunoglobulinas nativas (tales como cadena pesada de Ig humana). Típicamente, la secuencia señal está unida en la misma fase de lectura al polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

2.2 Origen de replicación

Los orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica, siendo el de pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias gram-negativas, el del plásmido 2 μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes virales tales como el de SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamíferos. Generalmente, para vectores de expresión de mamífero integrados no se necesita el componente del origen de replicación de SV40. Sin embargo, el ori de SV40 puede incluirse, ya que contiene el promotor temprano.

2.3 Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de las dos. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de las células hospedadoras que no contienen el vector o los vectores. Las células que se han transformado satisfactoriamente con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención sobreviven debido a, por ejemplo, resistencia a fármacos conferida por el marcador de selección administrado conjuntamente. Un ejemplo es

el sistema de selección de DHFR en el que los transformantes se generan en cepas de hospedador negativas para DHFR (por ejemplo, véase Page y Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). En este sistema, el gen de DHFR se administra conjuntamente con las secuencias del polinucleótido anticuerpo de la invención y las células positivas para DHFR después se seleccionan por retirada de nucleósidos del medio. Si es necesario, también se emplea el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación del gen de la DHFR. Por medio de la unión operativa del gen de DHFR a las secuencias codificantes de anticuerpos de la invención o derivados funcionales de las mismas, la amplificación del gen de la DHFR produce la amplificación concomitante de las secuencias de anticuerpo deseadas de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección con DHFR/metotrexato y en la técnica están bien establecidos métodos de amplificación y selección de células hospedadoras usando el sistema DHFR, véase Kaufman R.J. et al J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621, como revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, agosto de 1998. Otro ejemplo es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Bebbington et al Biotechnology 1992 Vol 10 p169). Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1*; véase Stinchcomb et al Nature 282, 38, 1979.

2.4 Promotores

Los promotores adecuados para la expresión de anticuerpos de la invención se unen operativamente del ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para hospedadores procariontes incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de Beta-lactamasa y de lactosa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen los de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levadura inducibles incluyen los de la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para la expresión en sistemas celulares de mamífero incluyen promotores de la ARN polimerasa II incluyendo promotores virales tales como el promotor de polio, virus de la viruela de las aves de corral y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, virus del sarcoma de Rous (RSV) y el promotor temprano o tardío del virus de simio 40 y promotores no virales tales como EF-1alfa (Mizushima and Nagata Nucleic Acids Res 1990 18(17):5322). La elección del promotor puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

2.5 Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de o además de los que se encuentran localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotioneína e insulina. Como alternativa, se puede usar un elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polio, potenciador de baculovirus o locus IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). Aunque estos potenciadores típicamente se localizan en el vector en un sitio cadena arriba del promotor, también pueden localizarse en otros sitios, por ejemplo, dentro de la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posicionamiento del potenciador pueden basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

2.6 Poliadenilación/Terminación

En sistemas eucariotas, hay señales de poliadenilación unidas operativamente al polinucleótido que codifica el anticuerpo de esta invención. Estas señales típicamente se ponen en posición 3' de la fase de lectura abierta. En sistemas de mamífero, las señales ejemplares no limitantes incluyen las procedentes de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes virales (por ejemplo de SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levadura, los

- ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de la fosfoglicerato quinasa (PGK) y la alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En un sistema procariota típicamente no se requieren las señales de poliadenilación y en su lugar es habitual emplear secuencias
- 5 terminadoras más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

2.7 Otros métodos/elementos para mejorar el rendimiento

- 10 Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones específicos para la célula hospedadora. El uso de codones del anticuerpo de esta invención puede modificarse para adaptar la desviación de codones de la célula hospedadora, tal como para aumentar la
- 15 transcripción y/o el rendimiento (por ejemplo Hoekema A et al Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). La elección de los codones puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

2.8 Células hospedadoras

- 20 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican los anticuerpos de la invención son células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* (por ejemplo ATCC 31.446; 31.537; 27.325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*
- 25 *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B.subtilis* y *B.licheniformis* (véase el documento DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. Entre las células hospedadoras de levadura, también se contemplan *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*,
- 30 *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16.045; 12.424; 24178; 56.500), *Yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183. 070, véase también Peng et al J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244, 234), *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A.nidulans* y *A.niger*.

69

Aunque la invención contempla específicamente células hospedadoras procariotas y de levadura, sin embargo, típicamente, las células hospedadoras de la presente invención son células de vertebrados. Las células hospedadoras de vertebrados adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N° CRL 1850) 5 COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, PerC6 (CruCell), células renales de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL 1632), BHK570 (ATCC N°: CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo, CHO-K1, ATCC N° CCL 61, una línea celular CHO DHFR-negativa tal como DG44 (Urlaub *et al*, Somat Cell Mol Genet (1986) Vol 12 páginas 555-588), 10 particularmente las líneas de células CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células renales de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), células Hep G2 y células de mieloma o linfoma, por ejemplo, NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

15 De esta manera, en una realización de la invención, se proporciona una célula hospedadora transformada de manera estable que comprenda un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico descrito en este documento. Típicamente, esta célula hospedadora comprende un primer 20 vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Estas células hospedadoras también pueden modificarse adicionalmente por ingeniería genética o adaptarse para modificar las propiedades, función y/o 25 rendimiento del anticuerpo de esta invención. Los ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas específicas de modificación (por ejemplo, glicosilación) y chaperonas de plegamiento de proteínas.

2.9 Métodos de Cultivo Celular.

30 Las células hospedadoras transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden cultivarse por cualquier método conocido por los especialistas en la técnica. Las células hospedadoras pueden cultivarse en matraces rotatorios, matraces de agitación, matraces cilíndricos, reactores de agitación por ondas (por ejemplo, System 1000 de wavebiotech.com) o

69

sistemas de fibras huecas, pero para la producción a gran escala se prefiere usar reactores de depósito agitado o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) para cultivos en suspensión. Típicamente, los depósitos agitados están adaptados para la aireación usando, por ejemplo, rociadores, compuertas o propulsores de bajo cizallamiento. En el caso de las columnas de burbujeo y reactores de agitación por inyección de aire puede usarse la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero, éste puede suplementarse con un agente protector de células tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir las lesiones celulares como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula hospedadora, pueden usarse microsoportes como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden adaptarse a cultivos en suspensión (lo cual es típico). El cultivo de las células hospedadoras, particularmente células hospedadoras de vertebrados, puede utilizar una diversidad de modos de operación tales como un procesamiento discontinuo, semicontinuo o discontinuo repetido (véase Drapeau *et al* (1994) *cytotechnology* 15: 103-109), un proceso discontinuo prolongado o un cultivo de perfusión. Aunque las células hospedadoras de mamífero transformadas de manera recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero tales como medios que comprenden suero bovino fetal (FCS), se prefiere cultivar estas células en medios sin suero tales como los descritos en Keen *et al* (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios disponibles en el mercado tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), suplementado cuando es necesario con un fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de las células hospedadoras puede requerir que esas células se adapten al crecimiento en condiciones sin suero. Una estrategia de adaptación es cultivar dichas células hospedadoras en medio que contiene suero y cambiar de manera repetida 80% del medio de cultivo por el medio sin suero de manera que las células hospedadoras aprendan a adaptarse a las condiciones sin suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg K *et al* (1995) en *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. *et al* eds), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados en el medio pueden recuperarse y purificarse a partir del medio usando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso para el que están destinados. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de

5 pacientes humanos típicamente exige una pureza de al menos 95% determinada por SDS-PAGE reductora, más típicamente una pureza de 98% o 99%, en comparación con el medio de cultivo que comprende los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los desechos celulares del medio de cultivo típicamente se retiran usando centrifugación seguido de una etapa de clarificación del

10 sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, el anticuerpo puede recogerse por microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Se dispone de una diversidad de técnicas distintas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía en hidroxiapatita (HA),

15 cromatografía de afinidad (opcionalmente que implica un sistema de señalización de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de diversas etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad de Proteína A o G seguido de etapas de cromatografía

20 adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato amónico. Típicamente, también se emplean diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (típicamente

25 monoclonal) que comprende al menos 10 mg/ml o más, por ejemplo 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y, por lo tanto, constituye una realización de la invención. Puede generarse una concentración de 100 mg/ml o superior por ultracentrifugación. Convenientemente, estas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

30

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Estos fragmentos se localizan dentro de la célula o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles pueden extraerse y replegarse para formar proteínas activas de acuerdo con métodos conocidos por los

especialistas en la técnica, véase Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3. Composiciones farmacéuticas

- 5 Las preparaciones purificadas de anticuerpos de la invención (particularmente anticuerpos monoclonales) descritas anteriormente, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos tales como los indicados anteriormente. Típicamente, estas composiciones además comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable (es
- 10 decir, inerte) conocido y requerido por la práctica farmacéutica aceptable, véase, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª ed, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de estos vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponada con tampones adecuados tales como acetato sódico trihidrato a un pH
- 15 farmacéuticamente aceptable, tal como un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o infusión continua convenientemente carecen de materia en partículas visibles y pueden comprender de 1 mg a 10 g de anticuerpo terapéutico, típicamente de 5 mg a 1 g,
- 20 más específicamente de 5 mg a 25 mg o 50 mg de anticuerpo. Los métodos para la preparación de estas composiciones farmacéuticas son bien conocidos para los especialistas en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden de 1 mg a 10 g de los anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones de uso. Las
- 25 composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) para reconstituirse antes de la administración de acuerdo con métodos bien conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, a la composición farmacéutica se le puede añadir un quelante de
- 30 iones metálicos incluyendo cobre, tal como citrato (por ejemplo, citrato sódico) o EDTA o histidina, para reducir el grado de degradación mediada por metal de anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un solubilizante tal como una base de

arginina, un agente detergente/anti-agregación tal como polisorbato 80 y un gas inerte tal como nitrógeno para reemplazar el oxígeno del espacio superior del vial.

Las dosis eficaces y los regímenes de tratamiento para administrar el anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente, y la enfermedad o trastorno a tratar. Estos factores están dentro del ámbito del médico a cargo del caso. Puede encontrarse una guía para la selección de las dosis apropiadas, por ejemplo, en Smith et al (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York, pero en general será de 1 mg a 10 g. En una realización, el régimen de dosificación para el tratamiento de un paciente humano es de 1 mg a 1 g del anticuerpo terapéutico de la invención administrado por vía subcutánea una vez a la semana o cada dos semanas, o por infusión intravenosa cada 1 ó 2 meses. Esta dosificación corresponde a 0,014-140 mg/kg, tal como 0,014-14 mg/kg. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse profilácticamente.

4. Usos clínicos.

Se apreciará que las enfermedades caracterizadas por una elevación de los niveles de β -amiloide o por depósitos de β -amiloide incluyen la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con β -amiloidosis de tipo Dutch, angiopatía β -amiloide cerebral y diversos tipos de demencias degenerativas tales como las asociadas con la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, degeneración basal cortical y enfermedad de Alzheimer del tipo de cuerpos de Lewy difusos.

Más preferiblemente, la enfermedad caracterizada por una elevación de los niveles de β -amiloide o depósitos de β -amiloide es la enfermedad de Alzheimer.

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

Ejemplos

Métodos

	Biacore™/Biacore 3000	un dispositivo que permite medir las cinéticas a tiempo real de interacciones moleculares usando SPR
5	SPR	(resonancia de plasmón superficial) ~ fenómeno físico empleado por los instrumentos Biacore™ para medir los cambios de masa en un chip de detección
	CM5	chip de detección Biacore™ con una superficie de propósitos generales recubierta con una matriz de dextrano carboximetilada
10	ELISA	ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima
	SRU	Tecnología de biosensor SRU BIND™ que permite controlar las interacciones bioquímicas sin marcador
	Integra CL1000	Mini-biorreactores vendidos por IBS Integra
15	Biosciences	
	FMAT	tecnología de ensayo de microvolumen fluorimétrico (Applied Biosystems)
	ABI8200	sistema de detección celular confocal macro de fluorescencia de Applied Biosystems 8200 para FMAT
20	FPLC	Cromatografía líquida de proteína rápida
	ProSepA HiTrap	Columnas de Proteína A para FPLC vendidas por GE
	Healthcare	

25 **Materiales**

	DMSO	dimetilsulfóxido
	HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
	Tris HCl	- hidrocloreuro de tris-(hidroximetil)aminometano
30	NaCl	- cloruro sódico
	Tween-20	- monolaurato de polioxietilenosorbitano
	BSA	- albúmina de suero bovino
	PBS	- solución salina tamponada con fosfato
	PFA	- paraformaldehído

	IMS	-	alcohol metilado industrial
	DAB	-	3,3'diaminobencidina
	DMEM		medio de Eagle modificado por Dulbecco
	FCS		suero bovino fetal
5	Opti-MEM		medio basado en el medio de Eagle modificado de Invitrogen/Gibco
	Lipofectamine		agente de transfección de células basado en lípidos catiónicos vendido por Invitrogen/Gibco
	Transfast		agente de transfección liposomal vendido por Promega
10	Versene		agente quelante de iones metálicos (ácido etilendiaminatetraacético)
	Glutamax		forma estable de glutamina añadida al medio de cultivo (suplemento dipeptídico L-Ananil-L-Glutamina)
	Histoclear		agente de aclaramiento de tejidos
15	tampón HBS-EP		Tampón Biacore™ para propósitos generales que contiene HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0,005%

20 **Generación de anticuerpo monoclonal de ratón 2E7**

El anticuerpo monoclonal de ratón 2E7 se generó a partir de una inmunización convencional de ratones. Se inmunizaron ratones con β -amiloide 1-40 y 1-42 soluble o agregado, formulado en adyuvante de Freund. Después del refuerzo final sin adyuvante, los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma. Las células

25 fusionadas se dejaron crecer en placas de 96 pocillos, en las que los sobrenadantes de los híbridos se sometieron a una investigación para encontrar posibles indicios. El anticuerpo seleccionado 2E7, que se obtuvo por inmunización con β -amiloide 1-40 soluble, era de isotipo IgG2a murino y tenía actividad de unión a beta-amiloide en el ensayo de salida descrito más adelante y una afinidad de 36,1

30 pM para el beta-amiloide 1-40 medida por Biacore™, Método A(i) (Tabla 10A).

Mapeo de Epítopos de 2E7

76

Para mapear finalmente la unión del anticuerpo 2E7 al péptido β -amiloide, se utilizó una serie de péptidos (A). La serie de péptidos (A) consistía en una serie de 31 péptidos solapantes de 12 aminoácidos que cubrían la secuencia completa del péptido β -amiloide 1-42. Cada péptido secuencial se inició en el aminoácido secuencial dentro del péptido β -amiloide, cambiando de esta manera la secuencia cubierta entre péptidos secuenciales por un solo aminoácido. Todos los péptidos de la serie (A) contenían un enlazador C-terminal de 3 aminoácidos (glicina-serina-glicina) y un resto de lisina biotinilado terminal. Además, todos los péptidos excepto el péptido A β 1 DAEFRHDSGYEVGSGK-biotina (SEC ID N°: 15) estaban acetilados en el extremo N. Una segunda serie de péptidos (serie (B)) consistía en deleciones secuenciales C-terminales de un aminoácido de un péptido que contenía los aminoácidos 1 a 10 de la secuencia de β -amiloide. Todos los péptidos de la serie (B) contenían un enlazador C-terminal de 3 aminoácidos (glicina-serina-glicina) y un resto de lisina biotinilado terminal, pero con restos adicionales de glicina y serina para reemplazar los aminoácidos de β -amiloide delecionados (Tabla 2). De esta manera, todos los péptidos de la serie (B) tiene la misma longitud.

Tabla 2

Secuencias de péptidos biotinilados (serie (B)) que
contenían fragmentos N-terminales truncados de β -amiloide

DAEFRHDSGYGSGGSK-biotina	(SEC ID N°: 7)
DAEFRHDSG--GSGGSGSK-biotina	(SEC ID N°: 8)
DAEFRHDS--GSGGSGGK-biotina	(SEC ID N°: 9)
DAEFRHD--GSGGSGGSK-biotina	(SEC ID N°: 10)
DAEFRH--GSGGSGGSGK-biotina	(SEC ID N°: 11)
DAEFR--GSGGSGGSGSK-biotina	(SEC ID N°: 12)
DAEF--GSGGSGGSGGSK-biotina	(SEC ID N°: 13)
DAE--GSGGSGGSGGSGK-biotina	(SEC ID N°: 14)

30

Control de la unión de 2E7 a péptidos derivados de β -amiloide usando Biosensores Ópticos

Se lavaron placas recubiertas con estreptavidina SRU Bind™ de 96 pocillos (SRU Biosystems) con PBS que contenía DMSO al 1% para retirar el glicerol y el

conservante. Se dejó un volumen de 50 µl/pocillo a temperatura ambiente para proporcionar un valor basal constante. Los péptidos biotinilados se diluyeron a aproximadamente 0,3 µg/ml en PBS que contenía DMSO al 1%, se añadieron 50 µl de cada uno a los pocillos y se incubaron durante aproximadamente 1 h. Se prepararon pocillos por duplicado usando diferentes sectores de la placa y se usó al menos un control sin péptido en cada sector para restar la referencia de los datos. Después de la captura de los péptidos, la placa se lavó con PBS que contenía DMSO al 1%, dejando 50 µl de tampón reciente por pocillo para proporcionar un nuevo valor basal en el lector. No se observó ninguna descomposición del péptido de la superficie. El tampón después se reemplazó con 40 µl/pocillo de tampón que contenía anticuerpo de ensayo a una concentración 20-64 nM durante 2 horas. Se descubrió que el anticuerpo 2E7 sólo se unía al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 del péptido β-amiloide en la serie de péptido (A) (péptido Aβ1, SEC ID N°: 15). Este resultado implica que el ácido aspártico en el resto 1 es crítico para la unión a este péptido.

Para caracterizar adicionalmente el sitio de unión del anticuerpo 2E7, se utilizó la serie de péptidos (B). Usando la metodología del biosensor SRU BIND™, el anticuerpo 2E7 mostró una unión insignificante a los péptidos que incluían los aminoácidos 1-3 y 1-4 del péptido β-amiloide (SEC ID N°: 14 y 13). La unión a un péptido que incluía los aminoácidos 1-7 del péptido β-amiloide (SEC ID N°: 10) fue comparable a la del péptido que incluía los aminoácidos 1-12 del péptido β-amiloide (de la serie de péptidos (A)). Se observó la unión a péptidos que incluían los aminoácidos 1-5 ó 1-6 del péptido β-amiloide (SEC ID N°: 12 u 11), pero fue más débil (medido por la estabilidad después de una etapa de lavado adicional) que la unión al péptido que incluía los aminoácidos 1-7 del péptido β-amiloide (SEC ID N°: 10).

De esta manera, se ha demostrado que sólo se requieren los restos 1-7 del péptido β-amiloide para la unión total, medido usando esta metodología.

Ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial

Además de los experimentos descritos anteriormente, se usó el biosensor óptico Biacore™ 3000 para controlar la unión del anticuerpo 2E7 a péptidos derivados de

la secuencia de β -amiloide seleccionados. La unión se midió inyectando anticuerpos de ensayo a una concentración de hasta 64 nM durante 5 minutos sobre los péptidos capturados en distintas superficies de chips de estreptavidina (130-230 RU (unidades de resonancia)). Se usó un tampón de procesamiento (HBS-EP) que contenía HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM y Surfactante P20TM al 0,005% a 25°C a un caudal de 20 μ l/min. Todos los ensayos utilizaron una doble referencia frente a una superficie blanco de estreptavidina e inyecciones blanco. El análisis se realizó usando el software de análisis BiacoreTM BIAevaluationTM versión 4.1. Los resultados de los péptidos seleccionados de la serie (A) confirmaron adicionalmente los datos obtenidos con SRU BINDTM indicando que 2E7 se unía únicamente al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 (SEC ID N°: 15) del péptido β -amiloide con una constante de equilibrio aparente KD de aproximadamente 50 pM. En las mismas condiciones, 2E7 no se unía al péptido que incluía los aminoácidos 2-13 del péptido β -amiloide.

15 Péptido A β 2-13 AEFRHDSGYEVHGSGK-biotina (SEC ID N°: 44)

El método experimental y las condiciones usadas permitieron la detección de moléculas de alta afinidad, pero también de menor afinidad – en el mismo sistema experimental, a diferencia de lo que ocurría con 2E7, se demostró que otro anticuerpo que reconocía un epítipo N-terminal del péptido β -amiloide se unía al péptido 2-13 (SEC ID N°: 44) con una KD aparente de 7 nM. 2E7 no se unía a una selección de péptidos de la serie (A) procedentes de regiones intermedias del péptido β -amiloide. En otro experimento, el péptido β -amiloide 1-40 se capturó a través de su resto de ácido aspártico N-terminal que se había biotinilado. Este péptido se capturó en un chip recubierto con estreptavidina BiacoreTM como se ha descrito previamente. El anticuerpo 2E7 inyectado a una concentración 66 nM durante 1 minuto no pudo unirse a este péptido. Por lo tanto, se concluye que el sitio de unión N-terminal descrito previamente se enmascaraba por el enlazador y el método de captura, confirmando adicionalmente que el extremo N contiene el sitio de unión al núcleo.

Unión de la Proteína Precursora de Amiloide (APP) Expresada en Células

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

Para caracterizar la unión de un anticuerpo a la APP de longitud completa de la superficie celular, se utilizó un ensayo FMAT™ basado en ABI8200.

Transfección de células HEK293T con ADN de APP de tipo silvestre

- Se mantienen células HEK293T en medio DMEM F12 que contiene FCS al 10% (v/v) y 1x Glutamax. Las células se siembran en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² y se dejan crecer hasta una confluencia de 60-80% (18-24 h) antes de la transfección. Para la transfección, se mezclan 9 μ g de ADN (ADN de APP de tipo silvestre (en el vector pCDNA3.1 (Invitrogen)), o vector sólo en los controles) con 0,3 ml de medio Opti-MEM™. Se mezclan 30 μ l de agente de transfección Lipofectamine™ con 0,3 ml de medio Opti-MEM™ y se reúnen las dos mezclas. Las mezclas reunidas se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la adición de 4,8 ml más de medio Opti-MEM™. La mezcla final se añade a las células después de lavar con medio Opti-MEM™ durante 5 h y después se añaden 6 ml de suero de ternero recién nacido al 10% (v/v) en DMEM. 48 horas después de la transfección, se retira el sobrenadante, la monocapa se lava en Versene y después se añaden 3 ml de agente quelante Versene™ a cada matraz, se incuban durante 5 minutos a 37°C, y las células separadas se centrifugan a 200 g durante 5 minutos. El sedimento celular resultante se resuspende suavemente en 1 ml de tampón de ensayo (suero tratado con calor al 2%, BSA al 0,5%, NaN₃ al 0,1% en PBS pH 7,4, filtrado a través de un filtro de 0,2 μ m) para crear una suspensión de una sola célula.

Ensayo basado en ABI8200 FMAT™

- Se diluyeron anticuerpos de ensayo (2E7, IgG de ratón LN27 (Zymed) contra el dominio extracelular de APP como control positivo, y un anticuerpo G210 que reconoce la forma x-40 del péptido β -amiloide como control negativo) a 10 μ g/ml en tampón de ensayo filtrado de forma estéril (suero tratado con calor al 2%, BSA al 0,5%, NaN₃ al 0,1% en PBS pH 7,2) en una placa de polipropileno, y después se

realizaron seis diluciones más seriadas 1:1 en la placa. Como blanco se usó tampón de ensayo sólo. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos se le añadieron 50 µl de una suspensión de células HEK293T transfectadas con ADN de APP de tipo silvestre (Experimento 1: 10.000 células; Experimento 2: 20.000 células), y se añadieron 5 µl de cada una de las soluciones de anticuerpo a pocillos para obtener un duplicado. Después se añadieron a cada pocillo 50 µl/pocillo de solución madre de IgG anti-ratón F-MAT™ azul, (el anticuerpo se marca usando el colorante reactivo monofuncional azul F-MAT™ de ABI, 4328408), diluido 1:500 (Experimento 1) y 1:1000 (Experimento 2) en tampón de ensayo, y la placa se agitó brevemente y se dejó sedimentar durante 1 hora. La placa después se leyó usando el sistema de detección celular confocal macro de fluorescencia ABI 8200 (Applied Biosystems).

Los datos de recuentos obtenidos después se interpretaron usando el software de la hoja de cálculo Excel™. En resumen, los recuentos de las células transfectadas de forma simulada se restaron de los recuentos de células transfectadas con APP de longitud completa para obtener una señal específica para cada anticuerpo. Se eligieron dos concentraciones de anticuerpo que estaban en la parte lineal de la curva (1,25 y 0,63 µg/ml), los recuentos obtenidos corregidos con respecto al efecto de fondo a esas concentraciones se expresaron como el porcentaje de unión al anticuerpo LN27, y se calculó la media de los datos obtenidos a las dos concentraciones de anticuerpo. Los datos resultantes se describen en la Tabla 3 (% de unión a LN27 ±SE)

De esta manera, dentro de este sistema de ensayo, la unión de 2E7 a APP de la superficie celular no se puede distinguir de la del anticuerpo de control negativo G210.

Tabla 3

anticuerpo	Experimento 1	Experimento 2
LN27	100,0 ± 7,1	100,0 ± 4,7
G210	5,5 ± 1,3	2,0 ± 1,6
2E7	9,9 ± 3,7	2,2 ± 1,4

Unión al Péptido Derivado de la Proteína Precursora de Amiloide

Los estudios de mapeo de epítomos descritos anteriormente han demostrado que el anticuerpo 2E7 se une al extremo N del péptido β -amiloide, siendo esencial el resto de ácido aspártico en la posición 1 para la unión. Esto sugiere que el anticuerpo reconoce un epítomo 'neo' formado por la escisión de APP en el sitio de la β -secretasa. Esta observación sugeriría que el anticuerpo 2E7 no debe reconocer la secuencia del péptido APP adyacente. Para ensayar esta hipótesis, se sintetizó un péptido APP (Péptido APP1, SEC ID N°: 16) que incluía los restos 1-7 del péptido β -amiloide y los cinco aminoácidos derivados de APP adyacentes. De esta manera, el péptido APP1 contenía aminoácidos contiguos desde la posición 5 N-terminal en el sitio de escisión BACE-1 a la posición 7 C-terminal en el sitio de escisión BACE-1 y estaba acetilado N-terminalmente. La capacidad del anticuerpo 2E7 de unirse al péptido derivado de APP APP1 y el péptido β -amiloide 1-12) (péptido A β 1) se comparó usando la metodología Biacore™ (como se ha descrito previamente para el mapeo de epítomos). El anticuerpo 2E7 mostró una alta afinidad de unión al péptido β -amiloide A β -1, que contiene el epítomo básico 1-7. Sin embargo, no se observó ninguna unión al péptido APP1 que también contiene la secuencia 1-7 derivada del β -amiloide básico.

20	Péptido A β 1	DAEFRHDSGYEVGSGK-biotina SEC ID N°: 15
	APP1	AcNH-SEVKMDAEFRHDGSGK-biotina SEC ID N°: 16

Se ha utilizado una combinación de unión celular basada en FMAT™ y mapeo de péptidos basado en Biacore™ para demostrar que, en estos formatos, 2E7 no tiene afinidad de unión por la proteína APP de longitud completa. Dado que el resto de ácido aspártico en la posición 1 del péptido β -amiloide es necesario para la unión, se concluye que 2E7 sólo reconoce el extremo N 'neo' del péptido β -amiloide y, por lo tanto, no debe unirse a la APP expresada en la superficie celular.

Actividad Biológica In Vivo

Modelo de Salida de 1^{25} β -Amiloide

Varios estudios publicados han demostrado que los anticuerpos contra el β -amiloide pueden formar complejos con el péptido β -amiloide en la corriente sanguínea. Se indica que esta formación de complejos de β -amiloide periférico facilita la salida de

amiloide del SNC a la corriente sanguínea (DeMattos RB, PNAS (2001), 98(15); 8850-8855). Se creó un modelo farmacodinámico agudo para seleccionar anticuerpos con respecto a su capacidad de formar complejos con péptido β -amilolde derivado de cerebro en la corriente sanguínea.

- 5 Se indujo anestesia (isoflurano al 4%) en ratones C57/BL6J macho y se mantuvieron (isoflurano al 1,5%) en oxígeno al 100%. Después, los animales se pusieron en un marco estereotáxico. Después de una incisión en la línea media a lo largo de la sutura sagital, se perforó un orificio a través del cráneo y se insertó una
- 10 cánula guía en el ventrículo cerebral lateral (coordenadas anteroposterior (AP) -0,5 mm, lateral (L) +0,7 mm, ventral (V) -2,5 mm). Se perforaron dos orificios más a través del cráneo en los que se pusieron tornillos corticales. La cánula se ancló en su sitio por medio de gel de cianoacrilato y la incisión se suturó alrededor de la tapa de gel de cianoacrilato. Después de la operación, los ratones recibieron 0,3 ml de
- 15 solución salina por vía subcutánea y se pusieron en un medio caliente para que se recuperaran de la anestesia. Tras la recuperación del reflejo de enderezamiento, los ratones se encerraron individualmente y recibieron cuidados convencionales durante los 5 días siguientes a la operación. No se permitieron procedimientos durante los 5 días posteriores o hasta que se recuperó el peso previo a la
- 20 operación. Después de la recuperación, se verificó la colocación de la cánula por la respuesta de ingestión de líquido a la angiotensina II. Cada ratón recibió la administración intracerebroventricular (ICV) (5 μ l) de 100 ng de angiotensina II (AII) (reconstituida en solución salina al 0,9%). Después de la administración de AII, se observó la ingesta de agua durante 15 minutos. En los estudios se incluyeron
- 25 ratones con una respuesta dipsogénica positiva a la AII (ingestión de líquido sostenida), que comenzó no antes de cinco días desde la inyección de AII.

- En el día del estudio, los ratones se pusieron durante 5-10 minutos en un medio caliente para inducir la vasodilatación, necesaria para facilitar la inyección en la
- 30 vena de la cola. Se inyectó anticuerpo de ensayo (600 μ g) o vehículo de PBS (con un volumen de dosificación no mayor de 10 ml por kg de peso corporal) a través de la vena de la cola y los ratones se devolvieron a sus jaulas individuales después de la inyección. Exactamente una hora después de la inyección en la vena de la cola, en los ratones se inyectó ICV lentamente (2 μ l por minuto) con 2 ng (1 μ Ci) de ^{125}

beta-amiloide 1-40 (Amersham Biosciences, UK) en un volumen de dosificación de 5 µl. Exactamente cuatro horas después de la dosis ICV, se recogieron 50 µl de sangre del tronco y se midió el nivel de radiactividad en un contador de centelleo.

- 5 Los ratones que habían recibido inyecciones de 2E7 en la vena de la cola (n = 6 por grupo de tratamiento) mostraron un aumento estadísticamente significativo en la señal radiactiva (cuenta por minuto – CPM) en 50 µl de sangre del tronco en comparación con la señal de CPM detectada en los ratones inyectados con vehículo (CPM – vehículo: $1339,7 \pm 496,2$ frente a 2E7 $4387,9 \pm 980,3$;
10 ANOVA: $F(2,13) = 4,97$, $p < 0,05$. Post-hoc LSD: $p = 0,01$ 2E7 frente a vehículo [post-hoc Duncans: $p = 0,02$ 2E7 frente a vehículo]).

- En dos estudios adicionales con 2E7 realizados con un protocolo idéntico, se observaron aumentos similares en la salida de amiloide al interior de la sangre en
15 comparación con los controles que habían recibido inyecciones de vehículo (CPM sangre: Vehículo 352 ± 113 frente a 2E7 2397 ± 353 , y Vehículo 1281 ± 312 frente a 2E7 5291 ± 885 ; ANOVA con ensayo post-hoc LSD $p < 0,001$ frente a vehículo).

20

Modelos Transgénicos de Reducción de β-Amiloide del SNC

1. Carga de β-Amiloide después de una dosificación de 4 semanas en ratones TASTPM de 2 meses de edad

- Se encerraron individualmente ratones transgénicos TASTPM macho y hembra
25 (APP^{swe} x PS1.M146V doble-mutantes, Howlett DR (2004) Brain Research 1017 (1-2) 130-136) con edades comprendidas entre 61 y 65 días al inicio del estudio. Se asignaron números iguales de ratones a cada grupo de tratamiento (N = 12 por grupo) y se distribuyeron aleatoriamente de acuerdo con el sexo y la edad. Los grupos de tratamiento comprendían lo siguiente: A: MOPC21 (anticuerpo con
30 especificidad desconocida, Holton et al (1987) J.Immunol 139(9) 3041-3049, control negativo), B: 2E7 (anticuerpo de ensayo). Todos los anticuerpos se disolvieron en PBS y se administraron por vía intraperitoneal. Independientemente del peso del animal, se administraron 300 µg de anticuerpo. Los animales recibieron la dosificación dos veces por semana durante cuatro semanas. Un día después de la

- dosificación final, los animales se sacrificaron por una sobredosis con pentobarbital sódico. Los cerebros se diseccionaron y se hemiseccionaron. Se recogieron muestras de cerebro hemiseccionado en tubos eppendorf™ de 2 ml pesados previamente y se congelaron inmediatamente. Posteriormente, las muestras se
- 5 descongelaron, se volvieron a pesar y se añadió 1 ml de guanidina HCl 5 M que contenía comprimidos de Complete protease inhibitor™ (Boehringer Mannheim), antes de homogeneizar las muestras y de incubarlas a 4°C durante un periodo >90 min con agitación constante.
- 10 Después, las muestras se diluyeron 1 a 10 en tampón de ensayo (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% + BSA al 1%), se sometieron a agitación vorticial y se centrifugaron a 20.000 G durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se retiró y se añadió como muestras por triplicado a la placa de ensayo.
- 15 Los niveles de A β 40 y A β 42 se midieron usando el inmunoensayo electroquimioluminiscente basado en placas sensibles (BioVeris™) empleando anticuerpos contra β -amiloides específicos del extremo C (contra A β 40 o A β 42) marcados con el marcador específico Oritag™ para facilitar la detección (BioVeris™) usados para capturar A β 40 o A β 42, junto con un anticuerpo contra A β
- 20 específico por el extremo N biotinilado. Se capturaron complejos de anticuerpo-A β con perlas recubiertas con estreptavidina que se unen a los anticuerpos biotinilados (Dynabeads™, Dynal) incubadas durante una noche a temperatura ambiente con mezcla vigorosa y se ensayaron en un fotodetector BioVeris™ M8. Se construyeron curvas patrón usando péptidos A β 40 y A β 42 humanos en tampón de ensayo que
- 25 contenía la concentración requerida de Guanidina HCl. Los datos se analizaron usando un software de análisis estadístico Excel Robosage™ y los niveles de A β se expresaron como pmol/g de tejido.

En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la carga de A β 42 del

30 SNC en 37% ($p < 0,001$) y la carga de A β 40 del SNC en 23% ($p < 0,001$).

En los estudios posteriores en condiciones experimentales similares, el anticuerpo 2E7 redujo la carga de A β 42 del SNC en 38% (Estudio 1, sólo machos), 22% (Estudio 2, no significativo) y 39% (Estudio 3, machos, $p = 0,001$) y 13% (Estudio 3,

hembras, no significativo) en comparación con los animales tratados con PBS. En estos estudios, 2E7 también redujo la carga de A β 40 del SNC en 18% (Estudio 3, machos, $p = 0,017$) y ofreció una reducción no significativa en A β 40 del SNC en 25% (Estudio 1, sólo machos), <1% (Estudio 2) y un aumento no significativo de 3% (Estudio 3, hembras) en comparación con los animales tratados con PBS.

2. Carga de β -Amiloide después de una dosificación de 4 meses en ratones TASTPM de 4 meses de edad

En resumen, a ratones transgénicos TASTPM de 4 meses de edad se les administraron 300 μ g de anticuerpo una o dos veces por semana a través de la vía intraperitoneal (i.p.). Después de 4 meses de dosificación, se midieron los niveles de β -amiloide del SNC por ELISA y se midió la carga de placas por inmunohistoquímica. Entre las edades de 4 y 8 meses, la carga de β -amiloide del SNC aumenta exponencialmente y por consiguiente, se desarrolla rápidamente la patología de las placas (Howlett DR (2004) Brain Research 1017 (1-2) 130-136).

Se encerraron individualmente ratones con edades comprendidas entre 120 y 128 días al inicio del estudio. Se asignaron números similares de ratones a cada grupo de tratamiento (N=20 ó 21 por grupo) y se distribuyeron aleatoriamente de acuerdo con el sexo y la edad. Los grupos de tratamiento comprendían lo siguiente: A: PBS (vehículo) administrado dos veces por semana, B: 2E7 administrado una vez por semana, C: 2E7 administrado dos veces por semana, D: PBS administrado una vez por semana. Se administró una dosis de 300 microgramos (un volumen de 79 microlitros) de 2E7 por vía intraperitoneal. Los animales tratados con vehículo recibieron el mismo volumen de PBS. Se administró la dosificación a los animales durante dieciocho semanas. Los ratones TASTPM pueden sufrir ataques espontáneos y como resultado varios animales murieron durante el transcurso del estudio. Los números finales fueron los siguientes A: 4 hembras, 9 machos; B: 5 hembras, 8 machos; C: 4 hembras, 9 machos; D: 2 hembras, 9 machos. Dos o cuatro días después de la dosificación final (números iguales por grupo) los animales se sacrificaron por sobredosis con pentobarbital sódico. Se tomó una muestra de la punta de la cola de cada ratón para confirmar el genotipo. Los cerebros se diseccionaron y hemiseccionaron. El hemisferio derecho se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% y se procesó para un análisis histológico. El

hemisferio izquierdo se recogió en tubos eppendorf™ de 2 ml pesados previamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C para un análisis posterior del contenido de amiloide. Antes del análisis, se descongelaron muestras, se volvieron a pesar y se añadió 1 ml de guanidina HCl 5 M que contenía comprimidos de Complete protease inhibitor™ (Boehringer Mannheim), antes de homogeneizar las muestras y de incubarlas a 4°C durante un período >90 min con agitación constante.

Después, las muestras se diluyeron 1 a 10 en tampón de ensayo (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% + BSA al 1%), se sometieron a agitación vorticial y se centrifugaron a 20.000 G durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron adicionalmente 1:1000 y se añadieron como muestras por triplicado a la placa de ensayo.

Los niveles de A β 40 y A β 42 se midieron de la misma manera que en el estudio de dosificación de 4 semanas.

Se usó un análisis de varianza utilizando como efectos fijados el tratamiento, el sexo y el programa de dosificación incluido en el modelo. También se incluyeron todas las interacciones entre los tres factores. No hubo diferencias significativas entre los dos programas de dosificación (una o dos veces por semana). Con este diseño experimental, en primer lugar pudo evaluarse si había alguna diferencia significativa entre los programas de dosificación y, en segundo lugar, como no había ninguna de estas diferencias significativas, los datos de los dos programas de dosificación pudieron combinarse, aumentando de esta manera la potencia del experimento al duplicar el número de ratones en el análisis.

En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la carga de A β 42 del SNC en 22,5% ($p = 0,0152$). Los niveles de A β 40 del SNC también se redujeron en 12,1%, pero esta cifra no alcanzó significado estadístico ($p = 0,118$).

Se realizó un análisis inmunohistoquímico complejo de estas muestras para definir el área de tejido cerebral que mostraba patología de placas. Se tomaron secciones de la corteza al nivel del núcleo caudado y de la corteza al nivel del hipocampo. Se

87

tiñeron las secciones adyacentes con un anticuerpo específico para A β 40 o A β 42 o, como alternativa, con el tinte de amiloide Rojo Congo. Usando un software de análisis de imágenes, el área de la sección teñida para las placas se expresó como un porcentaje del área de la sección total.

5

Después de la fijación, se cortaron en corona mitades de los cerebros sumergidas en PFA en una matriz cerebral en secciones de 6 x 2 mm de espesor. Estas secciones de 2 mm se denominarán secciones A a F, siendo A la más rostral y F la más caudal. Las secciones A, B y C y D, E y F se pusieron en cassettes de inclusión separados numerados para cada animal. Los cassettes se mantuvieron en PFA hasta que estuvieron listos para el procesamiento y la inclusión.

10

La inclusión se realizó en un procesador de tejidos Citadel™ 1000 (Shandon). Todos los tejidos recibieron el siguiente régimen de procesamiento:-

15

IMS al 70% – 1 h

IMS al 100% – 3 x 1 h

etanol al 100% – 2 h

alcohol isobutílico al 100% ; 1 x 2 h; 1 x 1,5 h

Histoclear™ – 2 x 1,5 h

20

Cera de parafina – 2 x 2 h

25

Después de finalizar el ciclo de procesamiento, las secciones de tejido incluidas en cera se transfirieron a moldes de base rellenos de cera de parafina fundida y se incluyeron utilizando un sistema de inclusión de parafina Histocentre™ (Shandon). El tejido se incluyó de tal forma que las secciones A, B y C entraron en un molde; y las secciones D, E y F en un segundo molde. Esto se hizo para todas las series de secciones, es decir, cada cerebro hemiseccionado dio como resultado dos bloques de cera de tres secciones cada uno. Las secciones se pusieron en los moldes de tal forma que la superficie caudal de cada pieza se convirtiera en la superficie de corte futura. Se tuvo cuidado de asegurarse de que cada sección estaba bien apretada en el molde de forma que cada corte de microtomo se realizara en paralelo. Después, el cassette de procesamiento perforado se puso cuidadosamente en cada molde, que posteriormente se llenó con cera fundida. Los bloques incluidos después se enfriaron en la placa refrigerada hasta que pudieron extraerse de los moldes. Los bloques se

30

almacenaron a temperatura ambiente hasta que se requirieron para realizar los cortes con el microtomo. Los bloques se cortaron aleatoriamente y se pusieron secciones de 5 micrómetros sobre portaobjetos recubiertos con gelatina marcados previamente (Superfrost™, Erie Scientific Company). Se aplicaron dos secciones en cada portaobjetos. Siempre que fue posible, se montaron secciones consecutivas y los portaobjetos se numeraron consecutivamente del 1 al 25. Se tomaron cincuenta secciones (25 portaobjetos) de cada bloque. Los portaobjetos se secaron en una placa caliente y después se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se utilizaron.

10

El análisis inmunohistoquímico se realizó en series de 30 portaobjetos. En cada portaobjetos, la sección superior se marcó con un anticuerpo A β 40 (G30, policlonal de conejo que reconoce x-40 β -amiloide), la sección inferior con el anticuerpo A β 42, 20G10, anticuerpo monoclonal que reconoce x-42 β -amiloide. Se marcó un mínimo de 5 secciones por anticuerpo y por bloque.

15

El marcaje se realizó como se indica a continuación. Después de retirar la cera por medio de HistoClear y alcoholes graduados, las secciones se sumergieron en ácido fórmico al 85% durante 8 minutos y después se bloquearon en peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 30 minutos para bloquear las peroxidasas endógenas. Se aplicaron anticuerpos G30 y 20G10 durante una noche a diluciones 1:1000, dejándose las secciones a 4°C. El revelado de las secciones se realizó con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón biotinilados respectivos. El desarrollo de color se realizó con un kit de tinción de tetrahidrocloreuro de diaminobencidina (DAB™, Vector Labs). Las secciones se tiñeron brevemente con un tinte de contraste de hematoxilina de Mayer antes de hidratarse, aclararse y taparse con un cubreobjetos.

20

25

Las secciones se dejaron secar durante al menos 48 horas antes de observarse al microscopio. Las imágenes se capturaron en un microscopio Leica DMRB™ equipado con una cámara digital. Las imágenes se analizaron usando el software Qwin™ (Leica) y los resultados se presentaron como porcentaje del área de sección que estaba marcada por el anticuerpo contra A β .

30

Se usó un análisis de varianza con tratamiento, sexo y programa de dosificación incluido en el modelo como efectos fijados. También se incluyeron todas las interacciones entre los tres factores. No hubo diferencias significativas entre los dos programas de dosificación (una o dos veces por semana). Con este diseño experimental, en primer lugar se pudo evaluar si había alguna diferencia significativa entre los programas de dosificación y, en segundo lugar, como no había ninguna diferencia significativa, los datos de los dos programas de dosificación pudieron combinarse, aumentando de esta manera la potencia del experimento al duplicar el número de ratones en el análisis.

10

En este paradigma, el tratamiento con anticuerpo 2E7 redujo la patología de las placas como se mide con un anticuerpo que reconoce A β 42. La patología de las placas se redujo en 27,1% ($p = 0,0026$) en la corteza al nivel del hipocampo y 43% ($p < 0,0001$) en la corteza al nivel del núcleo caudado. La patología de placas también se redujo cuando se midió con un anticuerpo que reconocía a A β 40. La patología de placas se redujo en 16,6% ($p = 0,0421$) en la corteza al nivel del hipocampo y 17,3% ($p = 0,0342$) en la corteza al nivel del caudado.

15

No se observó ningún indicio de microhemorragia (determinada por Azul de Prussian) en ningún ratón en este estudio tratado con vehículo o 2E7. Este método visualiza el hierro férrico (el hierro es un constituyente esencial de la hemoglobina que lleva el oxígeno presente en los glóbulos rojos) produciendo un compuesto azul insoluble. Todos los niveles de cerebro de todos los animales eran transparentes.

20

25 Modelos de cognición

Después de la dosificación durante 4 meses de ratones TASTPM de 4 meses de edad como se ha descrito anteriormente, estos ratones se sometieron a un ensayo en dos modelos de cognición: el ensayo de reconocimiento de objetos y el ensayo de acondicionamiento al miedo.

30

Ensayo de reconocimiento de objetos

El ensayo de reconocimiento de objetos explota la tendencia natural de los animales a explorar nuevos objetos y se basa en la capacidad de los animales de reconocer un objeto que han explorado previamente (objeto conocido). Se ha

- notificado que los ratones TASTPM de ocho meses de edad muestran una deficiencia en la capacidad de distinguir entre objetos nuevos y conocidos (Howlett et al., 2004), lo que indica un rendimiento cognitivo alterado en estos animales. Sin embargo, en este estudio, los ratones TASTPM de 8 meses de edad tratados con
- 5 vehículo no mostraron un deterioro cognitivo, es decir, pudieron distinguir entre objetos nuevos y conocidos. Por lo tanto, no hubo posibilidad de investigar ningún efecto terapéutico potencial resultante del tratamiento con 2E7.

Ensayo de acondicionamiento al miedo

- 10 El modelo de acondicionamiento al miedo se diseñó para ensayar la capacidad de los animales de correlacionar un estímulo doloroso previo con una señal contextual o de entrada y reconocerla cuando se presenta con el mismo contexto o señal después de un retraso de x horas. En este estudio, los ratones TASTPM de 8 meses de edad tratados con vehículo (una o dos veces por semana) mostraron una
- 15 deficiencia en la diferenciación contextual indicativa de un deterioro cognitivo en estos animales. Esta deficiencia no se vio afectada por el tratamiento con 2E7 cuando se administró una o dos veces por semana.

20 Dosificación durante 4 meses en ratones TASTPM de 6 meses de edad

- Este estudio implicó la administración de 2E7 (300 µg i.p. dos veces por semana) a ratones TASTPM durante 4 meses, empezando a los 3 meses de edad. Los animales de control recibieron IgG2A en PBS. Como se ha descrito anteriormente, los cerebros se diseccionaron y hemiseccionaron. El hemisferio derecho se fijó por
- 25 *inmersión en paraformaldehído al 4% y se procesó para la histología. El hemisferio izquierdo se recogió en tubos eppendorf™ de 2 ml pesados previamente, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C para el análisis posterior del contenido de amiloide.*

- 30 Se realizó un análisis preliminar de una sola sección de cada muestra de una selección aleatoria de muestras de cerebro (n = 6 vehículo, n = 7 grupo tratado con 2E7) por IHC usando el mismo protocolo general que se ha indicado anteriormente. El análisis estadístico (ensayo t de Student) demuestra que hubo una reducción significativa en la carga de placas de Aβ42 en el tálamo (71,9%, p = 0,007) y en el

tálamo + corteza + hipocampo (54,1%, $p = 0,022$) en ratones que recibieron 2E7 pero sin cambios significativos en A β 40.

Para la medición bioquímica de A β 40 y A β 42 en cerebro, las muestras se procesaron y se midieron como se ha indicado anteriormente (factor de dilución 1:10.000). A β 42 se redujo significativamente ($p = 0,01$) en 29,9% en los ratones que recibieron la dosificación de 2E7 ($n = 12$ control, $n = 16$ tratados). Las concentraciones de A β 40 también se redujeron (22,6%), pero esta reducción no pudo alcanzar un significado estadístico ($p = 0,052$).

Clonación de Regiones Variables de Hibridoma

Secuencias de Región Variable

Se extrajo el ARN total a partir de células de hibridoma 2E7 y después se generaron secuencias de ADNc del dominio variable de las cadenas pesada y ligera por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El cebador directo para la RT-PCR fue una mezcla de cebadores degenerados específicos para secuencias líder del gen de inmunoglobulina murina y el cebador inverso fue específico para las regiones constantes del anticuerpo, en este caso IgG2a de isotipo murino para la cadena pesada y kappa murina para la cadena ligera. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con la estrategia descrita por Jones y Bendig (Bio/Technology 9:88, 1991). La RT-PCR se realizó por duplicado para las dos secuencias de la región V para permitir la verificación posterior de las secuencias de la región V correctas. Los productos de la región V generados por RT-PCR se clonaron (Invitrogen TA Cloning Kit) y se obtuvieron los datos de secuencia.

Secuencia de Aminoácidos de V_H de 2E7 (SEC ID N°: 17)

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPRKGP EWIAFISNLA
YSIDYADTVTGRFTISRDNKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCVSGTWFA YWGQGT
LTVTSA

Secuencia de ADN de V_H de 2E7 (SEC ID N°: 18)

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
 CTGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACTTTTCAGTGACAACGGAATGGC
 GTGGGTTTCGACAGGCTCCAAGGAAGGGGCGCTGAGTGGATAGCGTTCATTAGT
 AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGGCCGATTCACCAT
 5 CTCTAGAGATAATGCCAAGAATACCCTGTACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGT
 CTGAGGACACGGCCATGTACTATTGTGTAAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGG
 GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Secuencia de Aminoácidos de V_L de 2E7 (SEC ID N°: 19)

10 DVVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRVVSQSLLSNGYTYLHWYLGKPGQSPKLLIYKV
 SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTRHVPYTFGGGKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de 2E7 ((SEC ID N°: 20)

GATGTTGTGCTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
 15 GCCTCCATCTCTTGACAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGGATACACC
 TATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTAC
 AAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATC
 AGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGA
 GTTTATTTCTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC
 20 CAAGCTGGAAATAAAA

En las secuencias de aminoácidos están subrayadas las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR).

25 **Clonación y Expresión de las Quimeras de 2E7**

Se generó un anticuerpo 2E7 quimérico (2E7c) que contenía las regiones V murinas parentales injertadas en la IgG1 humana (Fc mutado (L235A, G237A)) para la cadena pesada o regiones C kappa humanas para la cadena ligera para expresar material de anticuerpo recombinante que pudiera usarse para confirmar la clonación
 30 *correcta de regiones V murinas funcionales.* Se clonó ADN que codificaba regiones V de cadena ligera y de cadena pesada murinas de 2E7 y secuencias señal murinas endógenas en fase en los vectores de expresión de mamífero RLD-bshe (para la cadena pesada) y RLN-bshe (para la cadena ligera) que ya contenían

regiones constantes humanas (Fc de IgG1 mutado (L235A, G237A) o C kappa humana, respectivamente).

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

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

(la posición de los elementos y el tamaño total del vector indicado anteriormente sólo tienen fines ilustrativos y dependerán del tamaño del inserto de la cadena de anticuerpo)

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

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

(la posición de los elementos y el tamaño total del vector indicado anteriormente sólo tienen fines ilustrativos y dependerán del tamaño del inserto de la cadena de anticuerpo)

Se identificaron clones con las secuencias V_H y V_L clonadas correctamente y se prepararon plásmidos para la expresión en células CHO de cultivo en suspensión. El anticuerpo 2E7c expresado se purificó a partir del sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de proteína A en un sistema FPLC, y después se ensayó la unión a $A\beta$ por ELISA y SPR usando la tecnología Biacore™. Los resultados indicaron que se habían clonado y expresado las regiones V de ratón de 2E7 correctas, dando como resultado un anticuerpo funcional con características similares a las del anticuerpo 2E7 murino parental.

10 Humanización de Cadena Ligera

Se seleccionó una secuencia aceptora humana con el Genpept ID CAA51135 (SEC ID N°: 24) y el N° de acceso del Genbank X72467, que tenía una identidad de 77% a nivel de los aminoácidos (incluyendo las CDR) como región de marco aceptora. La construcción L1 es un injerto de las CDR murinas del dominio V_L de 2E7 en esta región de marco aceptora.

Humanización de Cadena Pesada

Se seleccionó la secuencia humana con el N° de acceso del Genbank M99675 (SEC ID N°: 21), un alelo del gen VH3-48 con una identidad de 74% a nivel de aminoácidos (incluyendo las CDR 1 y 2) con la región pesada variable de ratón de 2E7 como región de marco aceptora de cadena pesada humana junto con el minigen JH4 humano. Se diseñaron tres variantes de cadena pesada variable humanizada basándose en la secuencia de M99675 y JH4. H1 es un injerto de las CDR murinas usando la definición de Kabat con dos retromutaciones adicionales en la región de marco en las posiciones 93 y 94. H2 y H3 procedían de H1, pero incorporaron una mutación de región de marco adicional que era diferente en cada construcción; (posiciones 24 y 48 respectivamente; véase la Tabla 4).

Tabla 4

Construcción	Regiones de marcos de plantilla	Resto (N° de Kabat)	Humano	Ratón
H1	M99675 y JH4	93,94	A y R respectivamente	V y S respectivamente

H2	H1	24	A	V
H3	H1	48	V	I

Construcción de ADN de Cadena Ligera y Pesada Humanizada

- Se sintetizaron regiones V humanizadas *de novo* por acumulación de oligos solapantes y amplificación por PCR. Se incluyeron sitios de restricción para
- 5 clonación en vectores de expresión de mamífero RLD-bshe y RLN-bshe y secuencias señal de inmunoglobulina humana derivadas de las regiones de marcos aceptoras humana elegidas. Después, se clonaron los ADN que codificaban las regiones V humanizadas (H1 (SEC ID N°: 27), H2 (SEC ID N°: 29), H3 (SEC ID N°: 31), L1 (SEC ID N°: 33)) junto con secuencias señal y sitios de restricción en fase
- 10 en vectores de expresión de mamífero: H1, H2 y H3 en RLD-bshe para generar ADN que codificaba tres cadenas pesadas mutadas de Fc de IgG1 humana de longitud completa conteniendo cada una mutaciones L235A y G237A, H1 de longitud completa (SEC ID N°: 35), H2 de longitud completa (SEC ID N°: 37) y H3 de longitud completa (SEC ID N°: 39); L1 se clonó en fase en RLN-bshe que
- 15 contenía el ADN que codificaba la región constante kappa humana para generar ADN que codificaba una cadena ligera kappa humana de longitud completa (SEC ID N°: 41).

Ejemplos Representativos de Expresión de Combinaciones de Anticuerpo de Cadena Ligera y Pesada Humanizadas

- Se transfectaron de forma transitoria células CHOK1 a pequeña escala con todas las combinaciones de construcciones de ADN de cadena ligera y pesada humanizada: L1+H1, L1+H2, L1+H3 (SEC ID N°: 35 + 41, 37 + 41, 39 + 41) en
- 20 placas de 6 pocillos. Se cultivaron hasta la confluencia células CHOK1 sometidas a pases en DMEM F12, con 5% de suero bovino fetal con un contenido de IgG ultrabajo y glutamina 2 mM en placas de 6 pocillos. Las células confluentes se transfectaron con un total de 7,5 µg de DNA: 30 µg de lípido Transfast (Promega) en medio Optimem Glutamax (Invitrogen). Las células transfectadas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. A las 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se ensayó
- 25 la concentración de anticuerpo y después se ensayó la unión a Aβ humano por ELISA. La región L1 humanizada combinada con las tres cadenas pesadas humanizadas expresaron el anticuerpo completo que se unía a Aβ humano.
- 30

También se expresaron anticuerpos humanizados en transfecciones de células CHOK1 transitorias a gran escala usando la administración liposomal de ADN (por ejemplo, TransFast (Promega)) y expresión en frascos de cultivo. Para la optimización de los niveles de expresión en transfecciones transitorias, se usó una relación de ADN de vector de expresión entre cadena pesada y cadena ligera de 1:6. El material de la transfección transitoria se purificó usando columnas ProSepA o FPLC con columnas ProSepA HiTrap.

10

Evaluación de Variantes Humanizadas de 2E7 H1L1, H2L1 y H3 L1 en ELISA de Unión a β -Amiloide

Se evaluaron variantes humanizadas H1L1, H2L1 y H3L1 de 2E7 con respecto a la unión al péptido A β humano (1-40) biotinilado en el extremo C. El 2E7 quimérico se usó como referencia. Las Tablas 5-7 muestran los resultados con diversos lotes de material purificado a partir de las transfecciones transitorias a gran escala.

15

Tabla 5

ELISA	mAb	CE ₅₀ (μ g/ml)	Error Típico
Unión a A β	Quimera de 2E7c	0,033	0,00144
	H1L1	0,035	0,00142
	H2L1	0,048	0,00202
	H3L1	0,044	0,00105

20

Tabla 6

ELISA	mAb	CE ₅₀ (μ g/ml)	Error Típico
Unión a A β	Quimera de 2E7c	0,043	0,00183
	H1L1	0,051	0,00164
	H2L1	0,044	0,00191
	H3L1	0,055	0,00094

Tabla 7

ELISA	mAb	CE ₅₀ (μ g/ml)	Error Típico
Unión a A β	Quimera de 2E7c	0,044	0,00169
	H1L1	0,047	0,00265
	H2L1	0,041	0,00174
	H3L1	0,040	0,00116

Estos resultados indicaron perfiles de unión a A β muy similares para cada una de las variantes humanizadas derivadas de 2E7. La comparación de los valores de CE50 con el 2E7c mostró una pequeña pérdida de actividad de unión a A β que se había producido a lo largo del proceso de humanización.

5

Comparación de Variantes Humanizadas de 2E7 por ELISA competitivo

Se evaluaron anticuerpos quiméricos y humanizados de 2E7c H1L1, H2L1 y H3L1 con respecto a su capacidad de inhibir la unión entre el péptido A β humano y el MAb 2E7 de ratón parental en un ELISA competitivo.

10

Se establecieron dos tipos de ELISA competitivo para comparar la actividad de unión a A β de las tres variantes humanizadas en comparación con el anticuerpo quimérico 2E7.

1) *β -amiloide inmovilizado*; Se inmovilizó péptido A β (1-40) humano biotinilado a través de estreptavidina en placas ELISA. Se añadió anticuerpo 2E7 de ratón a una concentración constante junto con una serie de dilución de anticuerpos variantes humanizados derivados de 2E7. Después se detectó el MAb 2E7 de ratón unido con conjugado de IgG anti-ratón. La Tabla 8 muestra los resultados de los dos ensayos.

20

Tabla 8

MAb competidor	Experimento 1		Experimento 2	
	CI ₅₀ (μ g/ml)	Error Típico	CI ₅₀ (μ g/ml)	Error Típico
Quimera de 2E7c	1,31	0,20	1,29	0,13
H1L1	1,62	0,40	1,76	0,21
H2L1	1,28	0,26	1,66	0,28
H3L1	1,53	0,16	1,39	0,23

2) *β -amiloide en solución*; se preincubó una concentración constante de β -amiloide con una serie de dilución de variantes de anticuerpo 2E7 humanizado - se añadió la mezcla que incluía amiloide complejado y libre durante un corto periodo de tiempo a pocillos que contenían MAb 2E7 de ratón inmovilizado. Después se detectó la cantidad de β -amiloide libre que aún estaba disponible para la unión al MAb 2E7 parental inmovilizado. La Tabla 9 muestra los resultados de los dos ensayos.

25

Tabla 9

MAb competidor	Experimento 1		Experimento 2	
	CI ₅₀ (µg/ml)	Error Típico	CI ₅₀ (µg/ml)	Error Típico
Quimera de 2E7c	0,052	0,006	-	-
H1L1	0,114	0,014	0,140	0,024
H2L1	0,075	0,009	0,119	0,014
H3L1	0,069	0,004	0,115	0,013

5 Todas las variantes de anticuerpo humanizado inhibían la unión del MAb 2E7 de ratón al β-amiloide con un perfil muy similar. Los valores de CI₅₀ generados para las variantes H2L1 y H3L1 fueron consistentemente próximos a los de la quimera 2E7c (cuando se usó), que tenía la mayor actividad inhibidora en los dos ensayos. Sin embargo, la variante H1L1 mostró una actividad inhibidora algo reducida en los dos ensayos, indicando una posible afinidad ligeramente menor para el β-amiloide.

10

Análisis SPR Biacore™ de 2E7, 2E7c, H1L1, H2L1, H3L1

Se evaluaron los parámetros cinéticos del MAb 2E7 de ratón recombinante, 2E7c quimérico y las variantes humanizadas H1L1, H2L1 y H3L1 que se unen al péptido beta-amiloide humano (1-40) y (1-42) usando el análisis Biacore™ en un Biacore™
15 3000. Se usaron dos formatos de ensayo diferentes.

Método A

(i) En resumen, se capturaron <20 unidades de resonancia del péptido beta-amiloide 1-40 (biotinilado en el extremo C) en un chip biosensor de estreptavidina
20 (como el usado para la Tabla 10A).

Los anticuerpos se diluyeron en tampón HBS-EP y se pasaron sobre la superficie de estreptavidina/beta-amiloide a concentraciones que variaban de 0,001 nM-8 nM (para la Tabla 10A). Se realizaron dos procesos separados; cada proceso se realizó en una nueva superficie de estreptavidina/beta-amiloide. Los procesos 1 y 2 fueron
25 esencialmente iguales aunque hubo algunas diferencias en los parámetros usados; el proceso 1 se realizó usando una superficie de chip en la que se capturaron 16 Unidades de resonancia de beta-amiloide, y se usaron concentraciones de anticuerpo de 0,001 nM-8 nM, un tiempo de asociación de 4 minutos y un tiempo de

disociación de 20 minutos a un caudal de 50 μ l por minuto. Para el proceso 2, se capturaron menos de 10 RU de α beta-amiloide y se usaron concentraciones de anticuerpo de 0,003125 nM-8 nM. El caudal y los tiempos de asociación fueron iguales a los del proceso 1, sin embargo el tiempo de disociación se redujo a 15 minutos.

(ii) Los beta-amiloides (1-40) y (1-42) se acoplaron a amina en diferentes superficies de un chip biosensor CM5 a un nivel de <20 unidades de resonancia (como se usa para la Tabla 10B).

Los anticuerpos se diluyeron en tampón HBS-EP y se pasaron sobre la superficie de biosensor/beta-amiloide a concentraciones que variaban de 1 nM-64 nM (como se usa para la Tabla 10B).

Método B

En el segundo caso se invirtió el ensayo, ya que primero se capturaron los anticuerpos a un nivel de 1000-2500 unidades de resonancia en una superficie de anticuerpo policlonal de IgG anti-ratón (para el MAb 2E7 de ratón recombinante) o una superficie con proteína A (para H2L1 humanizado) de un chip biosensor CM5. El beta-amiloide (1-40) o (1-42) recién preparado se diluyó en tampón HBS-EP y se pasó sobre la superficie con anticuerpo capturado a concentraciones que variaban de 4-500 nM (Tabla 10C y 10D).

En los dos métodos, la regeneración se realizó por un pulso de H_3PO_4 100 mM y para la Tabla 10A los datos también se siguieron por un pulso de NaOH 50 mM. Se demostró que la superficie era estable y no se veía afectada por la regeneración. Todos los procesos utilizaron dobles referencias contra inyecciones blanco de tampón. El análisis se realizó usando el software de análisis Biacore™ BIAevaluation versión 4.1.

Resultados

Se usó el método A(i) para clasificar los anticuerpos por los datos cinéticos de unión al beta-amiloide. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10A. Esto demuestra que el Mab 2E7 parental tiene una KD de 36,1 pM para el beta-amiloide capturado por estreptavidina. El anticuerpo de ratón-humano quimérico mostró una KD ligeramente reducida de 45,8 pM y las construcciones humanizadas varían de 54

- (H2L1) a 93,6 pM (H1L1). En conclusión, esto demuestra que el procedimiento de humanización había sido muy satisfactorio y se había perdido muy poca afinidad. Las retromutaciones adicionales introducidas para H2 y H3 tenían un efecto pequeño pero beneficioso, aunque las diferencias entre las construcciones de H2 y H3 están dentro de las desviaciones típicas para estos experimentos.

Tabla 10A

Anticuerpo		k_a	k_d	KD (pM)
2E7	Proceso 1	1,61e6	6,17e-5	38,3
	Proceso 2	1,69e6	5,72e-5	33,8
	Media (SD)	1,65e6	5,97e-5	36,1 (3,2)
c2E7	Proceso 1	1,34e6	6,44e-5	48,1
	Proceso 2	1,3e6	5,65e-5	43,5
	Media (SD)	1,32e6	6,10e-5	45,8 (3,3)
H1L1	Proceso 1	5,60e5	5,32e-5	95,0
	Proceso 2	6,37e5	5,87e-5	92,2
	Media (SD)	5,99e5	5,60e-5	93,6 (2,0)
H2L1	Proceso 1	9,91e5	5,76e-5	58,1
	Proceso 2	1,1e6	5,49e-5	49,8
	Media (SD)	1,05e6	5,63e-5	54,0 (5,9)
H3L1	Proceso 1	8,24e5	6,26e-5	76,0
	Proceso 2	8,3e5	4,75e-5	57,2
	Media (SD)	8,27e5	5,47e-5	66,6 (13,3)

- El método A(ii) se usó para confirmar que los dos restos aminoacídicos adicionales en el extremo C del beta-amiloide (1-42) en comparación con el beta-amiloide (1-40) no alteraban significativamente las propiedades de unión de 2E7 y H2L1. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 10B y confirmaron esto.

Tabla 10B

Anticuerpo	Beta-amiloide	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (pM)

2E7	1-40	4,05e5	1,28e-4	317
	1-42	3,82e5	1,51e-4	394
H2L1	1-40	3,33e5	1,22e-4	366
	1-42	3,40e5	1,55e-4	456

El método B se usó para negar los efectos de avidéz que podían verse en el primer formato de ensayo. Los efectos de avidéz, producidos por los dos dominios Fab de una sola molécula de anticuerpo que se une al mismo tiempo a dos moléculas de beta-amiloide adyacentes en la superficie del biosensor (o

en formas multiméricas de beta-amiloide) aumentarían la afinidad aparente de la unión. Las mediciones de afinidad obtenidas usando el método B se muestran en la Tabla 10C.

Tabla 10C

Anticuerpo	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM) Con Desviación Típica n = 3
2E7	2,83e5 ± 0,54e5	4,28e-4 ± 0,65e-4	1,58 ± 0,55
H2L1	1,06e5 ± 0,27e5	7,50e-4 ± 0,50	7,32 ± 1,64

La prueba de que este ensayo proporcionó afinidades de unión 1:1 verdaderas se obtuvo cuando fragmentos Fab de H2L1, obtenidos por digestión con papaína, se unieron al beta-amiloide (1-40) capturado con estreptavidina por un método similar al método A(i) con una KD estimada de 2,4 nM.

El método B también se usó para confirmar que los dos restos aminoacídicos adicionales en el extremo C del beta-amiloide (1-42) en comparación con el beta-amiloide (1-40) no alteraban significativamente las propiedades de unión de un clon de secuencia idéntica al MAb 2E7 de ratón, denominado 2F11. Los datos obtenidos

se muestran en la Tabla 10D.

Tabla 10D

Anticuerpo	Beta- amiloide	k_a ($M s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (nM)
2F11	1-42	2,39e5	2,74e-4	1.14
2F11	1-40	2,99e5	3,92e-4	1.31

- 5 En un estudio similar al estudio de mapeo de epítopos en 2E7 usando el Ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial descrito anteriormente, H2L1 se comportó de forma similar al 2E7 en la unión al péptido que incluía los aminoácidos 1-12 ($A\beta$ 1, SEC ID N°: 15) del péptido β -amiloide y no al péptido que incluía los aminoácidos 2-13 del péptido β -amiloide ($A\beta$ 2-13, SEC ID N°: 44).

10

Actividad de H2L1 en el Modelo de Salida de I^{125} β -Amiloide

Para comparar funcionalmente el H2L1 humanizado con el 2E7 monoclonal de ratón parental, los dos se ensayaron el mismo día en el modelo de salida de I^{125} β -amiloide descrito anteriormente.

15

- Tanto H2L1 como 2E7 aumentaron significativamente las cuentas por minuto (CPM) en sangre en comparación con un control de vehículo. El recuento de CPM de radiactividad en sangre fue el siguiente (Vehículo: 1940 ± 166 ; 2E7 10065 ± 1386 ; H2L1 10913 ± 1535). Los parámetros estadísticos usados fueron ANOVA con
20 ensayo post-hoc LSD. $n = 7$ vehículo, $n = 6$ 2E7, $n = 6$ H2L1, ($p < 0,001$ para cada compuesto de ensayo frente a vehículo).

- Estos datos proporcionan pruebas adicionales de que el anticuerpo H2L1 humanizado ha retenido las propiedades funcionales mostradas con la molécula
25 2E7 de ratón.

Investigación de la Farmacocinética de H2L1 y 2E7

- Se investigó la vida media terminal del anticuerpo de ensayo en ratones. El anticuerpo de ensayo se administró por una infusión intravenosa de 1 h a 4 ratones
30 para conseguir una dosis diana de 400 μg por ratón. Se tomaron muestras de

sangre seriadas a partir de cada ratón hasta 5 días después de la dosificación (un ratón del grupo de 2E7 no completó el estudio y uno del grupo de H2L1 se retiró del análisis posterior porque se hizo evidente que la dosis no se había administrado i.v.). Los niveles de anticuerpo se midieron usando un ELISA de captura de β -amiloide.

El análisis de los datos indica que el anticuerpo H2L1 humanizado tiene una vida media terminal de aproximadamente 82 horas en ratones (Tabla 11), que es comparable a la del anticuerpo monoclonal de ratón parental 2E7 (aproximadamente 75 horas).

Tabla 11

Parámetro	Media $\pm$ SD (n = 3)
C _{máx} (μ g/ml)	291 $\pm$ 43
T _{máx} (h) #	2,0 (1,1-2,1)
CL _p (ml/h/kg)	0,9 $\pm$ 0,1
t _{1/2} (h)	82 $\pm$ 4
V _{ss} (ml/kg)	94 $\pm$ 12

mediana e intervalo

C_{máx} Concentración máxima en plasma observada.

T_{máx} Tiempo transcurrido hasta la concentración máxima en plasma observada

CL_p Aclaramiento total en plasma; Dosis/AUC_(0-inf).

t_{1/2} La vida media de fase terminal se determinó como la relación de $\ln 2/z$ donde z es la constante de la velocidad en fase terminal; calculada usando un análisis de regresión lineal no ponderado (después de la transformación logarítmica) de los pares de concentración-tiempo que se produjeron después del inicio evaluado visualmente de la fase terminal de log-lineal.

V_{ss} Volumen de distribución en estado estacionario; CL_p x MRT_{0-inf}.

inf.

Efecto de H2L1 sobre la carga de amiloide periférica en primates no humanos de edad avanzada

- Se realizó un estudio en monos *Cynomolgus* de edad avanzada (de aproximadamente 15 años) para investigar la relación de exposición-respuesta con respecto a la formación de complejos de amiloide/H2L1 y el aclaramiento y los posteriores efectos sobre los niveles de amiloide del CSF y el SNC. Se recogieron muestras de sangre y de CSF lumbar (tomadas con sedación con ketamina) semanalmente, 3 semanas antes de administrar la 1ª dosis de H2L1. Inmediatamente después del muestreo en la semana 3, los animales recibieron placebo (n = 10), 0,1 mg/kg (n = 5), 1 mg/kg (n = 5) o 10 mg/kg (n = 10) de H2L1 y después cada 2 semanas durante un periodo de 12 semanas. Se tomaron semanalmente muestras de sangre para realizar el análisis en plasma de H2L1 y A β ₄₂ total. Se recogieron muestras de CSF para la cuantificación de A β _{40/42} cada 2 semanas. Después de terminar el periodo de dosificación, los animales se sacrificaron para cuantificar en el cerebro el beta-amiloide por análisis bioquímico como se ha descrito anteriormente y para investigar las microhemorragias. En el grupo de menor dosificación (0,1 mg/kg), los animales se sacrificaron de forma escalonada para evaluar el posible efecto del transcurso del tiempo en los niveles cerebrales como consecuencia de la terminación de la dosificación y, por lo tanto, la saturación de las reservas plasmáticas de amiloide.

- Este estudio se aprobó por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de MACCINE Pte Ltd, o "Maccine" antes de iniciar la fase experimental. El número de protocolo de IACUC fue nº 08-2006. GSK ha realizado una visita al centro de Maccine y ha revisado su proceso ético y lo ha considerado aceptable.

- Las muestras de plasma se diluyeron en serie 1:10 a 1:50000 y se añadieron a A β ₄₀ aplicado como un recubrimiento en placas ELISA. Se crearon curvas patrón que variaban de 0–10 µg/ml de H2L1 en diluyente. Después de una incubación de una noche a 4°C, H2L1 se visualizó usando IgG anti-humana-peroxidasa de rábano picante (Amersham – diluido 1:2000 en diluyente) y un sistema de detección de tetrametilbencideno. Después de una administración iv en embolada individual y repetida, los niveles plasmáticos de H2L1 parecían aumentar de una manera dependiente de la dosis. No hubo indicios de ausencia de linealidad severa en la

farmacocinética, lo que indica que para la mayor parte del intervalo de dosificación, se consiguieron concentraciones molares en exceso de H2L1 en el plasma en comparación con los niveles de amiloide libre.

- 5 La A β ₄₂ total se midió en plasma puro usando un kit ELISA A β 1-42 disponible en el mercado (Innogenetics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, variando las curvas patrón de 500-7 pg/ml creado en el diluyente del kit. Las muestras y los patrones se incuban durante una noche a 4°C antes del ensayo por duplicado de acuerdo con las instrucciones del kit. Debe indicarse que debido a la interferencia
- 10 del anticuerpo de detección suministrado con el ensayo de A β ₄₂, este kit no puede usarse para medir los niveles de A β ₄₂ libre, sino que mide el A β ₄₂ 'total' aparente. Hubo un aumento dependiente de la concentración y de la dosis en A β ₄₂ (niveles mantenidos de aproximadamente 300, 125 y 25 pg/ml después de 10, 1 ó 0,1 mg/kg de H2L1 respectivamente).
- 15 Por los datos del análisis, es probable que el aumento en el "A β ₄₂ total" se deba al resultado de una salida significativa de amiloide del exterior de las reservas plasmáticas, que parecía dependiente de las concentraciones de H2L1 >1 µg/ml, y no parecían ser el resultado de la ausencia de aclaramiento del complejo. Esto fue evidente por la velocidad de eliminación del A β ₄₂ total así como la fluctuación en los
- 20 niveles totales en un intervalo de dosificación.

- Hasta la fecha sólo se han completado y analizado totalmente los análisis en plasma. Sin embargo, los análisis preliminares indican que había una tendencia hacia la reducción en el CSF y hacia el aumento en el hipocampo del nivel de A β ₄₂
- 25 'total' (medido como se ha descrito anteriormente en general) después del tratamiento con 10 mg/kg de H2L1.

- En algunas secciones cerebrales, se detectaron pequeñas áreas de microhemorragia como se muestra por el método de tinción con Azul de Perls
- 30 Prussian. Este método visualiza el hierro férrico (el hierro es un constituyente esencial de la hemoglobina que lleva el oxígeno presente en los glóbulos rojos) produciendo un compuesto azul insoluble. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia en la incidencia entre los animales tratados con vehículo y los tratados con fármaco.

Análisis en Macacos Cynomolgus de edad avanzada de placas de beta amiloide en el cerebro y del beta amiloide total en el plasma

En monos cynomolgus se han presentado parámetros en líquido cefalorraquídeo (CSF) y en tejidos de la AD humana. Se ha demostrado que el mono cynomolgus de edad avanzada tiene indicios de deposición de amiloides. (Covance, The cynomolgus monkey as a model for Alzheimer's disease. En: Buse E, Habermann G, Friderichs-Gromoll S, Kaspereit J, Nowak P and Niggemann K, editors. Poster Presentation at the 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, Louisiana, del 6 al 10 de marzo de 2005). La posibilidad de que H2L1 induzca una respuesta inapropiada (tal como encefalitis) en un cerebro envejecido se investigó en monos hembra que habían tenido crías previamente de edad avanzada, de aproximadamente 20 años. Además, también se investigó la seguridad, las microhemorragias relacionadas con el tratamiento, la neutralización/aclaramiento del material de ensayo, la hipersensibilidad y la enfermedad por complejos inmunes después de la administración intravenosa durante 8 semanas en intervalos de dos semanas. Además, se analizaron los niveles de $A\beta_{40/42}$ en muestras del SNC y de sangre.

Diseño del Estudio

A grupos de 5 (grupo 1), 9 (grupo 2) o 10 (grupo 3) monos cynomolgus hembra geriátricos se les administraron 0 (vehículo), 50 ó 100 mg/kg/dosis al día de H2L1 en vehículo (4 ml/kg) una semana sí y otra no durante un periodo de 8 semanas, por vía intravenosa, por medio de una administración en embolada lenta. El vehículo consistía en acetato sódico trihidrato a 6,81 mg/ml, edetato disódico dihidrato a 0,0186 mg/ml, polisorbato 80 a 0,2 mg/ml y base L-Arginina a 10 mg/ml, y el pH fue de 5,5. Los niveles de dosificación se eligieron para investigar niveles de dosificación que eran 5 y 10 veces los niveles de dosificación clínica deseada. Las siguientes evaluaciones se realizaron antes de la dosificación, diariamente (signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos), en la semana 4 y en la semana previa a la necropsia: observaciones en el animal vivo, peso corporal, temperatura corporal, hematología, química clínica (incluyendo el análisis del líquido cefalorraquídeo [CSF]), urianálisis y determinación de citoquinas en CSF. Después de la necropsia, se determinaron los pesos de los órganos, observaciones

macroscópicas y observaciones microscópicas del cerebro, médula espinal cervical y lesiones generales en todos los animales. Después de cada dosificación se realizó una evaluación toxicocinética.

5 Resultados

No hubo muertes no programadas, y no se produjeron signos que indicaran una influencia del artículo de ensayo sobre el estado general de los animales a las dosis administradas. Las únicas observaciones destacadas en la patología clínica (hematología y química del suero), según se concluyó, estaban relacionadas con la
10 edad y no con el artículo de ensayo.

La exposición sistémica a H2L1 (medida por $AUC_{0-\infty}$ y C_{max}) aumentó aproximadamente en proporción a la dosis. Para los dos grupos de dosificación, no hubo un cambio marcado (≥ 2 veces) en la exposición sistémica entre la 1ª dosis y
15 la 4ª dosis de los periodos de muestreo.

No se detectó ningún signo de reacciones inflamatorias en el cerebro detectadas por análisis del CSF, y no hubo ningún hallazgo macroscópico o microscópico en la necropsia que sugiriera la influencia del artículo de ensayo, específicamente no se
20 produjeron microhemorragias ni encefalitis.

Este estudio se realizó de acuerdo con las regulaciones de la Buena Práctica de Laboratorio como se indica en la Ley Alemana sobre Productos Químicos, anexo 1 y 2 en el artículo 19a Chemikalien Gesetz, junio de 2002, los Principios de OECD
25 de la Buena Práctica de Laboratorio (revisado en 1997, expedido en enero de 1998) ENV/MC/CHEM (98) 17 y el Documento Consenso "The Application of the OECD Principles of GLP to the Organisation and Management of Multi-Site Studies" ENV/JM/MONO(2002)9. Los estudios realizados de acuerdo con las regulaciones y normas anteriores se consideraron aceptables para las autoridades reguladoras de
30 la FDA de Estados Unidos.

Análisis de la Carga de Placas en el SNC

Los hemisferios cerebrales izquierdos de los macacos cynomolgus tratados con vehículo del estudio anterior se analizaron por inmunohistoquímica. Una sección en

corona, a nivel del surco temporal medio que contenía partes del giro dentado y del hipocampo se procesó en cera como se ha descrito anteriormente. Para la inmunohistoquímica, las secciones se marcaron con un anticuerpo pan-A β (1E8, anticuerpo monoclonal inducido contra A β 13-27) o con el anticuerpo A β 42 (20G10, anticuerpo monoclonal que reconoce a A β x-42) y el marcaje se realizó como se ha indicado anteriormente. Para cada sección se realizó un recuento visual del número de placas. Los tejidos de los cinco monos cynomolgus tratados con vehículo mostraron indicios de placas de A β parenquimáticas. También hubo indicios de A β marcado cerebrovascular y A β intraneuronal.

10

Análisis de complejos de beta amiloide/anticuerpo en plasma

Se realizó un análisis bioquímico en muestras plasmáticas a partir de dos puntos de tiempo (al final de las semanas 4 y 8 después de iniciar la dosificación) de animales que recibieron 50 mg/kg (n = 9) o 100 mg/kg (n = 10) de H2L1 o controles que recibieron vehículo (n = 5). Se analizaron muestras duplicadas de 100 μ l usando el kit ELISA de A β 1-42 Innogenetics disponible en el mercado, incubadas durante una noche a 4°C. Las muestras de control se analizaron tanto puras como a una dilución 1:10 (usando el diluyente suministrado), mientras que las muestras de los animales que recibieron la dosificación se ensayaron puras y a 1:25. Se analizaron los valores de absorbancia posteriores, deduciéndose los valores de absorbancia desconocidos en pg/ml usando curvas patrón, y después se corrigieron para cualquier dilución del ensayo. Los niveles plasmáticos totales de A β 42 obtenidos a partir de estas muestras se proporcionan en la Tabla 12 que se presenta más adelante (las cifras están en pg/ml $\pm$ SE); todas las muestras de los animales tratados con H2L1 contenían niveles significativamente mayores de A β 42 (p <0,001 por ensayo t de student) que en los grupos de control.

25

Tabla 12

	Semana 4 (pg/ml)	Semana 8 (pg/ml)
Control (1:10)	104,1 $\pm$ 30,4	29,8 $\pm$ 7,9
50 mg/kg (1:25)	830,5 $\pm$ 79,1	615,8 $\pm$ 50,2
100 mg/kg (1:25)	1020,5 $\pm$ 84,4	492,7 $\pm$ 46,3

Los datos presentados se obtuvieron a partir de muestras no diluidas. Los resultados de las muestras puras no se usaron, ya que muchos puntos de datos

30

eran mayores que el patrón superior o debido a la limitación del volumen de la muestra, sólo se ensayaron como un solo punto.

5 Proceso de producción

- Pueden usarse vectores de expresión que codifican H2L1 y unirse operativamente a marcadores de selección amplificables tales como la DHFR o la glutamina sintetasa para transfectar o transducir líneas de células CHO parentales apropiadas (por ejemplo, CHO DG44 o CHO K 1) para producir líneas celulares modificadas por ingeniería genética adecuadas para la producción de anticuerpos monoclonales a gran escala (como revisión, véase Bebbington and Hentschel DNA Cloning Volume III; A practical approach (editado por Glover DM) (Oxford IRL press, 1987). Para aumentar los niveles de expresión, la secuencia codificante puede optimizarse con respecto a sus codones para evitar motivos de secuencia de actuación cis y contenidos extremos de GC (altos o bajos). Las SEC. ID N°: 42 y N°: 43 ilustran esta secuencia codificante para la cadena pesada H2 y la cadena ligera L1. La producción a gran escala puede realizarse en biorreactores de depósito de agitación usando medio sin componentes de origen animal, seguido de purificación. Esto puede comprender la clarificación del material recogido, seguido de cromatografía de afinidad en proteína A, y la purificación adicional usando intercambio iónico (por ejemplo, catiónico) y operaciones en unidades de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, hidroxapatita cerámica). La nanofiltración para la eliminación de virus se continúa por una etapa de ultrafiltración/diafiltración final que permite una formulación adecuada para la vía de administración deseada.

Ejemplo de Formulación farmacéutica

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (por ml)</u>
30	H2L1	50 mg
	Acetato sódico trihidrato	6,81 mg
	Polisorbato 80	0,20 mg
	Base arginina	10,00 mg
	Cloruro sódico	3,00 mg

Edetato disódico dihidrato	0,0186 mg
Ácido clorhídrico	cs para dar pH 5,5
Agua para inyección	Hasta 1,0 ml
Nitrógeno	Hasta rellenar el espacio superior

5

Secuencias de Aminoácidos de regiones V de Marcos Aceptoras y Variantes Humanizadas

- 10 **Región V de marco aceptora de cadena pesada de M99675, secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 21)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS
SSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

- 15 **ADN de región V de marco aceptora de cadena pesada de M99675 (SEC ID Nº: 22)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTA
20 GTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCT
CCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA

Secuencia de aminoácidos de región V de marco aceptora de cadena ligera de

- 25 **CAA51135 (SEC ID Nº: 24)**

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLQ
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEI
K

- 30 **ADN de región V de marco aceptora de cadena ligera de CAA51135 (SEC ID Nº: 25)**

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCC
GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACA
ACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATC

TATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGG
ATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTG
GGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAAATCAAA

5

Variante H1 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 26)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
AYSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGT

10 LVTVSS

Secuencia codificante de ADN de variante H1 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N°: 27)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
15 CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGC
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTACGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGG
20 GGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

Variante H2 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 28)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
25 AYSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGT
LVTVSS

ADN de variante H2 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N°: 29)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
30 CTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGC
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG

AM

CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGG
GGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

- 5 Variante H3 de región V de cadena pesada humanizada, secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 30)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWISFISNL
AYSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGT
LVTVSS

- 10 ADN de variante H3 de región V de cadena pesada humanizada (SEC ID N°: 31)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGGC
GTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCTCATTCAATAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCAACAT
15 CTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG
CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGG
GGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

- 20 Secuencia de aminoácidos de variante L1 de región V de cadena ligera humanizada (SEC ID N°: 32)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRVSQSLHHSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSQVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKEI
K

- 25 ADN de variante L1 de región V de cadena ligera humanizada (SEC ID N°: 33)

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCC
GGCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTACACAGTAATGGATACAC
CTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTA
TAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGAT
30 CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
GTTTATTACTGCTCTCAAACTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAGGGAC
CAAGGTGGAAATCAAA

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H1 madura (Fc mutado, mutación doble en negrita) (SEC ID N°: 34)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
AYSIDYADTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAYWGQGT
 5 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 10 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

ADN de longitud completa de H1 (SEC ID N°: 35)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
 15 GGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
 GGATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGG
 CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAG
 TAATTTGGCATATAGTATCGACTACGCA
 GACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACT
 20 GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGC
 CGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGG
 GCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCT
 CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG
 CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
 25 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAG
 GCGCCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTT
 CCGGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA
 CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
 30 GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCT
 TCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACAC
 CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT

GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
 GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
 GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC
 5 CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
 AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
 10 ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

15 **Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H2 madura (Fc mutado, doble mutación en negrita) (SEC ID N°: 36)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
AYSIDYADTVTGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 20 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 25 SPGK

ADN de longitud completa de H2 (SEC ID N°: 37)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
 CTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATT
 30 CACCTTCAGTGACAACGGAATGGCGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
 CTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGTAATT
 TGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATCTCC
 AGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTAT

CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAG
 CGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
 GGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
 5 CTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
 CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 10 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
 AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
 CTCGCGGGGGGCACCGTCAGTCTTCTCT
 TCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
 ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
 15 AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
 GCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTG
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 20 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
 CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC
 CAGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC
 25 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 AA

30 **Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H3 madura (Fc mutado,
 mutación doble en negrita) (SEC ID N°: 38)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**D**NGMAWVRQAPGKGLEWIS**F**ISNL
 AYSIDYAD**T**VTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSG**T**WFAYWGQGT
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG