Digitalización y
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

CSA750140

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

1/27

21. **EXPEDIENTE No.** 09-81882

54. **TÍTULO** METODOS PARA SUMINISTRAR MOLECULAS Y OBJETIVOS DE ENLACE ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** UNIVERSITY OF ZURICH

DOMICILIO ZURICH, SUIZA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-081882- -00000-0000
Fecha: 2009-08-05 17:16:01 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 415

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: **UNIVERSITY OF ZURICH**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza.

Dirección: Prorektorat Forschung,
Rämiitrasse 71,
CH-8006 Zürich,
Suiza

Domicilio: Zürich,
Suiza

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número ____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Roger NITSCH**
Langwisstr. 27,
CH-8126 Zumikon,
Suiza

2. **Christoph HOCK**
Rietstrasse 43,
CH-8703 Erlenbach,
Suiza

3. **Christoph ESSLINGER**
Zollikerstrasse 3,
CH-8008 Zurich,
Suiza

4. **Marlen KNOBLOCH**
Kyburgstrasse 26,
CH-8037 Zurich,
Suiza

5. **Kathrin TISSOT**
Segantinistrasse 35,
CH-8049 Zurich,
Suiza

6. **Jan GRIMM**
Bürglistr. 16,
CH-8600 Düebendorf,
Suiza

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/000053 Fecha: 07 de enero de 2008
Publicación Internacional No. WO 2008/081008 Fecha: 10 de julio de 2008

6 Título (54)

MÉTODOS PARA SUMINISTRAR MOLÉCULAS Y OBJETIVOS DE ENLACE ESPECÍFICOS DE ENFERMEDADES (421)

7 Clasificación Internacional (51) C07K 016/018

8 Prioridad SI☒ NO☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	05 de enero de 2007	60/878,831
	EP	05 de enero de 2007	07000211.8
	US	11 de junio de 2007	60/934,291
	EP	17 de octubre de 2007	07020341.9

9

Comprobante de pago No.: 09-51,293 **Fecha:** 14 de julio de 2009
Comprobante de pago No.: 09-53,100 **Fecha:** 21 de julio de 2009
Comprobante de pago No.: 09-53,115 **Fecha:** 21 de julio de 2009

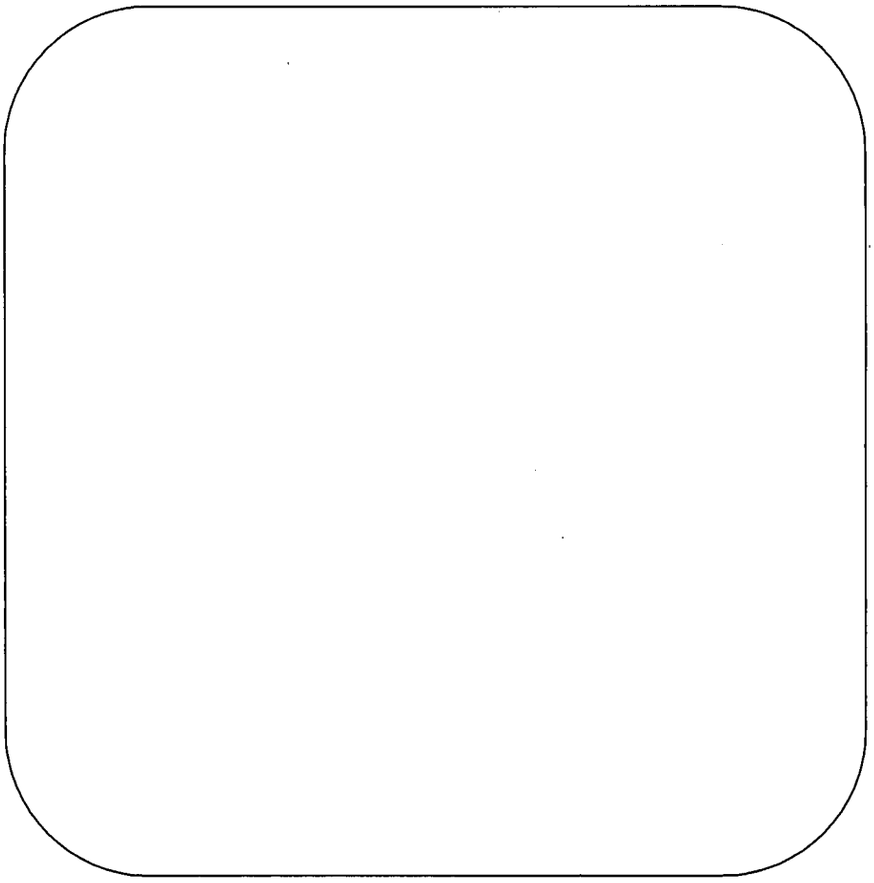
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 540.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 36 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por $900.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia Páez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/081008 A1

   Descripción:

   Páginas 111 en el idioma original

   Páginas 189 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 51

   Figuras: Número (s) 22

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

4. ☒ Listado de Secuencias

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

COLO-17119-841-001-0

5

2687

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, B – CO IBIA

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

75885
6473

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

UNIVERSITAT ZURICH

domiciliado (s) en/of : Prorektorat Forschung

Ramistrasse 71

CH-8006

Zurich, Swtzerland

hereby ratify the patente application No. 07040127 filed by Emilio Ferrero on April 23,2007

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el tercero representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso?administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales,

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternate in their turn shall end at such time

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above?named attorneys?at?law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property rights and against unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA ANTERIOR CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

ñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u servaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso?administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 6/12/07

en/in

por/by Prof. Dr. H. Murer
Vice President

Firma Signature

Official Certification

Seen for authentication of the reverse-side signature of

Heinrich Ulrich Paul Murer, Prof. Dr. rer. nat., born 6th August 1944, Swiss citizen of Beckenried NW, residing (according to his information) at Wilackerstrasse 18, CH-8134 Adliswil (Switzerland),
who is personally known to us.

The signature has been acknowledged in our presence by the authorized agent, Adrian Philippe Sigrist, born 27th March 1965, Swiss citizen of Kriens LU, residing (according to his own information) at Gfennstrasse 12a, Dübendorf (Switzerland).

Zurich, this 3rd July 2007

B No. 1339
Fee: Fr. 20.--

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH
U. Neuenschwander, Deputy Notary public

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH · KT. ZÜRICH ·

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA QUE ANTECEDE, CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

© CAVELIER ABOGADOS

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweizerische Eidgenossenschaft, Kanton Zürich
   Country: Swiss Confederation, Canton of Zurich
   Diese öffentliche Urkunde / This public document
2. ist unterschrieben von / has been signed by Herr lic. Neuenschwander
3. in seiner Eigenschaft als / acting in the capacity of Notariatsinspektorin
4. Sie ist versehen mit dem Stempel/Siegel des (der) / bears the stamp/seal of Notariat Stadt Zürich

Bestätigt / Certified

5. in / to 8090 Zürich / 8090 Zurich
6. am / the 11. Juli 2007
7. durch die Staatskanzlei des Kantons Zürich
   by Chancery of State of the Canton of Zurich
8. unter / under Nr. 1504/2007
9. Stempel / Siegel / Stamp / seal
10. Unterschrift / Signature

Fr. 30.–

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

7

Universität Zürich
Rechtsdienst

Künstlergasse 15
CH-8001 Zürich
Tel. +41 44 634 22 68
Fax +41 44 634 43 67
sven.akeret@rd.uzh.ch
www.rd.uzh.ch

Sven Akeret, lic. iur. RA
Rechtskonsulent der Universität
Leiter Rechtsdienst

TO WHOM
IT MAY
CONCERN

Zurich, October 16, 2006

Signatory Power

I confirm that Professor Dr. Heini Murer, Vice-President for Research, is an authorized administrative official for the purpose of contract signature in the name of the University of Zurich / Zurich, Switzerland, an educational institution domiciled in and organised under the laws of Switzerland.

Sven Akeret, lic. iur RA
Chief Legal Officer
University of Zurich

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Official Certification

Seen for authentication of the reverse side signature, acknowledged in our presence by

Sven Alex Akeret, born 1st April 1962, Swiss citizen of Schaffhausen SH and Nussbaumen TG (Switzerland), residing (according to his information) at Mühlegasse 29, CH-8213 Neunkirch (Switzerland),
who has identified himself by identity card.

Zurich, this 20th September 2007

B No. 1925
Fee: Fr. 20.--

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH

J. Morger, Notary public

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH KT. ZÜRICH

Official Certification

This is to certify that this copy corresponds exactly with the document shown to us this day and declared to be the original.

Zurich, this 24th September 2007

B No. 1947
Fee: Fr. 25.--

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH

J. Morger, Notary public

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH KT. ZÜRICH

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

8

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. **País:** Confederación Suiza, Cantón de Zurich
Confederação Suiça, Cantão de Zurique
El presente documento público / Este documento público

2. Ha sido firmado por Hch Jürg Hotpec
foi assinado por

3. Actuando en calidad de Notar
na sua qualidade de

4. Se halla sellado/timbrado con/está provisto do selo/carimbo do (da)
Notariat Thun-Zürcher

Certificado

5. En/em 8090 Zurich/Zurique 6. El/no día 3. Okt. 2007

7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich
pela Chancelaria de Estado do Cantão de Zurique

8. Con el número/sob o No. 20952/2007

9. Sello/timbre/selo/carimbo Fr. Sa - 10. Firma/Assinatura

I. Schärer

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

9

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 06A/10.07 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español, por el cual **UNIVERSITAT ZURICH**, domiciliada en Prorektorat Forschung, Ramistrasse 71, CH-8006, Zurich, Suiza, ratifica la solicitud de patente No. 07040127 presentada por Emilio FERRERO el 23 de abril de 2007 y otorga poder a **EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ Y DANIEL PEÑA**.

Dado y firmado el 6/12/07

Por Profesor Dr. H. Murer, Vicepresidente

Firma: [Firma ilegible]

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

* * *

Certificación oficial

Visto para autenticación de la firma que antecede de Heinrich Ulrich Paul Murer, Prof. Dr. rer. nat., nacido el 6 de agosto de 1944, ciudadano suizo de Beckenried NW, residente (según su propia información) en Wilacker-strasse 18, CH-8134 Adliswil (Suiza),

conocido personalmente por mí.

La firma ha sido reconocida en nuestra presencia por el agente autorizado, Adrian Philippe Sigrist, nacido el 27 de marzo de 1965, ciudadano suizo de Kriens LU, residente (según su propia información) en Gfennstrasse12a, CH-8600 Dübendorf (Suiza).

Zurich, 3 de julio de 2007

B No. 1339

Derechos: Fr. 20

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH

[Firma ilegible]

U. Neuenschwander, Notario Público Encargado

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zurich

Este documento público

2. Ha sido firmado por Urs Neuenschwander

3. Actuando en su capacidad de Notars (Ilegible)

4. Lleva el sello/timbre de Notariat Fluntern – Zürich

16

CERTIFICADO

5. 8090 Zürich 6. el 11 de julio de 2007

7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich

8. Bajo el No. **15041/2007**

9. Sello: (ilegible)

10. Firma [Firma ilegible]

María Martelo.
TRADUCCION No.: 06A/10.07
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

Universitat Zürich

A QUIEN CORRESPONDA

Zurich, 16 de octubre de 2006

Facultad del firmante

Confirmo que el Profesor Dr. Heini Murer, Vicepresidente de investigaciones, es un funcionario administrativo autorizado para efectos de firma de contratos en nombre de la Universidad de Zurich / Zurich, Suiza, una institución educativa domiciliada y organizada bajo las leyes de Suiza.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTUR
NOTARIA

[Firma ilegible]
Sven Akeret, lic. iur RA
Director Jurídico
Universidad de Zurich

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2007 OCT 16 P 12:08

Certificación oficial

Visto para autenticación de la firma que antecede, reconocida en nuestra presencia por

Sven Alex Akeret, nacido el 1 de abril de 1962, ciudadano suizo de Schaffhausen SH y Nussbaumen TG (Suiza), residente (según su propia información) en Mühlegasse 29, CH-8213 Neunkirch (Suiza),

quien se identificó a sí mismo mediante tarjeta de identidad.

Zurich, 20 de septiembre de 2007

B No. 1925
Derechos: Fr. 20

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH
[Firma ilegible]
J. Morger, Notario Público

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA. 16 OCT 2007

REPUBLICA DE COLOMBIA
Juan Manuel Santos Calderón
Notario Sexto
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

11

Certificación oficial

Por el presente se certifica que esta copia corresponde exactamente con el documento que nos fue presentado hoy y fue declarado como original.

Zurich, 24 de septiembre de 2007

B No. 1925
Derechos: Fr. 20

NOTARIAT FLUNTERN-ZÜRICH
[Firma ilegible]
J. Morger, Notario Público

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zurich
Este documento público
2. Ha sido firmado por Jurp Morger
3. Actuando en su capacidad de Notar
4. Lleva el sello/timbre de Notariat Fluntern – Zürich

CERTIFICADO

5. 8090 Zürich
6. el 3 de octubre de 2007
7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich
8. Bajo el No. **20952/2007**
9. Sello: (ilegible)
10. Firma [Firma ilegible]
I. Schärer

2007 OCT 16 P 12:03

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15885-841-001-8
MMA\ID-109963\WPC15885
OCT 09/07

TRADUCCION No.: 064/1007
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
29 JUL. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 15 OCT 2007

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

29 JUL. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 July 2008 (10.07.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/081008 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/000053

(22) International Filing Date: 7 January 2008 (07.01.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/878,831	5 January 2007 (05.01.2007)	US
07000211.8	5 January 2007 (05.01.2007)	EP
60/934,291	11 June 2007 (11.06.2007)	US
07020341.9	17 October 2007 (17.10.2007)	EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **UNIVERSITY OF ZURICH** [CH/CH]; Prorektorat Forschung, Rämistrasse 71, CH-8006 Zürich (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **NITSCH, Roger** [DE/CH]; Langwisstr. 27, CH-8126 Zumikon (CH). **HOCK, Christoph** [DE/CH]; Rietstrasse 43, CH-8703 Erlenbach (CH). **ESSLINGER, Christoph** [DE/CH]; Zollikerstrasse 3, CH-8008 Zurich (CH). **KNOBLOCH, Marlen** [CH/CH]; Kyburgstrasse 26, CH-8037 Zurich (CH). **TISSOT, Kathrin** [DE/CH]; Segantinistrasse 35, CH-8049 Zürich (CH). **GRIMM, Jan** [DE/CH]; Bürglistr. 16, CH-8600 Düebendorf (CH).

(74) Agent: **STEINECKE, Peter**; Müller Fottner Steinecke, P.O. Box 31 10 40, 80102 Munich (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

WO 2008/081008 A1

(54) Title: METHOD OF PROVIDING DISEASE-SPECIFIC BINDING MOLECULES AND TARGETS

(57) Abstract: Provided are novel specific binding molecules, particularly human antibodies as well as fragments, derivatives and variants thereof that recognize neoepitopes of disease-associated proteins which derive from native endogenous proteins but are prevalent in the body of a patient in a variant form and/or out of their normal physiological context. In addition, pharmaceutical compositions comprising such binding molecules, antibodies and mimics thereof and methods of screening for novel binding molecules, which may or may not be antibodies as well as targets in the treatment of neurological disorders such as Alzheimer's disease are described.

METHOD OF PROVIDING DISEASE-SPECIFIC BINDING MOLECULES AND TARGETS

Field of the Invention

[0001] The present invention relates to novel specific binding molecules, particularly human antibodies as well as fragments, derivatives and variants thereof that recognize disease-associated epitopes, including neoepitopes, of proteins which derive from native endogenous proteins, and which are prevalent in the body of a patient in a variant form and/or out of their normal physiological context. In addition, the present invention relates to pharmaceutical compositions comprising such binding molecules, antibodies and mimics thereof, and to methods of screening for novel binding molecules, which may or may not be antibodies, targets and drugs in the treatment of various disorders, in particular neurological disorders such as Alzheimer's disease, amyloidoses and beta-amyloid pathology.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] The success in generating monoclonal antibodies rests on the efficient and selective fusion of antigen-stimulated B cells with a murine myeloma cell line followed by selection of stable antibody producing hybrids as originally described by Köhler and Milstein, Nature 256 (1975), 495-497. However, the therapeutic utility of murine based antibodies in human is hampered by the human anti-mouse antibody (HAMA) response in view of their non-human origin. Approaches for making human or human-like monoclonal antibodies became available through genetic engineering. However, the methods hitherto available suffer from the drawback that they are not suitable to produce antibodies with the characteristics of those produced in the course of a physiological human immune response. Furthermore, such antibodies may not be specific enough because of cross-reactivity with other proteins and/or the target protein in context with normal physiological function. In case of Alzheimer's or Parkinson's disease, for example, antibodies that also cross-react with high affinity with physiological derivatives of amyloid precursor protein (APP) or

alpha synuclein are considered to exhibit side effects related to the normal functions of the physiologic target structures. In this respect, an undesired autoimmune disease would downrightly be induced – a hardly calculable risk in the conceptual design of active immunization experiments employing protein structures that, in variant form, also occur physiologically. Side effects not related to the target structure are, for example, anaphylactic reactions, as are to be expected as undesired and dreaded side effects of the systemic administration of exogenous proteins. According to recent findings, this can also be the case in so-called humanized antibodies, which originally stem from non-human organisms, usually from mice. On the other hand, active immunization with pathological relevant antigens bears the considerable risk of patients developing antibodies and T cell responses which also recognize physiological variants of such proteins and in consequence lead to a dangerous and uncontrollable autoimmune response.

[0003] Thus, there is a need of providing agents which are specific for a target involved in a disorder and which are tolerated by the human body.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0004] An object of the present invention is a method for identifying, validating and producing diagnostically and therapeutically useful binding molecules, in particular antibodies that are directed against pathologic variants of endogenous proteins. More specifically, the present invention relates to a method of isolating a disease-associated protein-specific binding molecule comprising:

[0005] (a) subjecting a sample obtained from a patient who is symptom-free, or who is clinically unusually stable, but who is affected with or at risk of developing a disorder to a specimen of pathologically altered cells or tissues with predetermined pathological characteristics; and

[0006] (b) identifying and optionally isolating a binding molecule which binds to said specimen but not to corresponding cells or tissues without such pathological characteristics as it may be derived from a healthy subject.

[0007] Known is the fact that, in case of autoimmune diseases, antibodies are directed against autologous cells and proteins or other compounds such as glycolipids expressed by said cells while evading the known tolerance mechanisms. Also known is the fact that, in case of endogenous neoplastic developments, a cellular and humoral immunity to the

neoplastic cells can develop and can thus effect an endogenous immunological protection mechanism against neoplastic tissue degeneration.

[0008] The present invention makes use of the surprising finding that antibodies can also be directed against pathophysiologically relevant variants of endogenous proteins, in particular against neoepitopes, which are formed due to pathologically altered transcription, translation, or post-transcriptional or post-translational modification, or proteolytic processing, or aggregation. Such antibodies are directed against endogenous proteins which, owing to their new structure that deviates from the normal physiology, become pathophysiologically relevant by means of developing pathological effects. For reasons of immune tolerance, the antibodies connected with the corresponding immune response to neoepitopes in such pathological variants do not normally exhibit any cross reactions against the physiologically functional proteins, however, as opposed to the case of autoimmune diseases. This is because the formation of potentially cross-reactive antibodies is specifically suppressed by the known tolerance mechanisms, whereas the development of an immune response to pathological neoepitopes can escape tolerance.

[0009] Hence, the present invention relates to a novel approach of identifying diagnostically, therapeutically, and preventively active binding molecules, especially antibodies and antibody fragments from clinically preselected human subjects by means of interaction with identifiable pathological structures.

[0010] The present invention is thus directed to antibodies or antigen-binding fragments and similar antigen binding molecules which are capable of recognizing epitopes, including neoepitopes, of disease-associated proteins which derive from native endogenous proteins and are prevalent in the body of a patient in a variant form, *e.g.* as a pathological protein and/or out of their normal physiological context. Furthermore, the present invention relates to compositions comprising said antibodies and to immunotherapeutic and immunodiagnostic methods using the same.

[0011] Furthermore, in antibody identification, the method according to the present invention can do without previous hypothesis on the identity of its molecular target structure, solely by means of its association with pathologically relevant structures. Besides the possibility of thus identifying molecular target structures hitherto unknown for specific diseases, a further advantage of antibodies that are exclusively directed against pathological structures is based on the fact that their pharmacodynamic availability is not negatively influenced by binding to non-diseased tissues in such a way that the antibody is

buffered with respect to its concentration and sink effects thus hampering the determination of therapeutically effective concentrations. Furthermore, the antibody and binding molecules of the present invention are preferably characterized in that they react with the variant form of the disease-associated protein *in vivo* or with a cell or cell membrane, and on a section of the pathologically characterized diseased tissue, respectively, but not or to a significantly lesser extent with the physiological variant of the cognate protein; see also, *e.g.*, Example 2.

[0012] Since the present invention enables identifying and isolating molecular target structures in diseased cells and tissues, a further embodiment concerns the antigen and pathological protein, *i.e.* disease-associated protein, respectively, which is bound by the neoepitope-specific antibody of the present invention.

[0013] A particularly preferred embodiment is a human antibody or antigen-binding fragment thereof which demonstrates the immunological binding characteristics of any of the antibody characterized by the variable regions V_H and/or V_L as set forth in Tables 2 and 3, *infra*. Alternatively, the antibody is a humanized, xenogeneic, or a chimeric human-murine antibody, the latter being particularly useful for diagnostic methods and studies in animals. Therapeutic compositions including the antibody or active fragments thereof, or agonists and cognate molecules, or alternately, antagonists of the same, and methods of use of such compositions in the prevention, diagnosis or treatment of a disease using these compositions are also included, wherein an effective amount of the composition is administered to a patient in need of such treatment.

[0014] The antigen-binding fragment of the antibody can be a single chain Fv fragment, an F(ab') fragment, an F(ab) fragment, and an $F(ab')_2$ fragment, or any other antigen-binding fragment. In a specific embodiment, *infra*, the antibody or fragment thereof is a human IgG isotype antibody.

[0015] Naturally, the present invention extends to the immortalized human B memory lymphocyte and B cell, respectively, that produces the antibody having the distinct and unique characteristics as defined below.

[0016] The present invention also relates to polynucleotides encoding at least a variable region of an immunoglobulin chain of the antibody of the invention. Preferably, said variable region comprises at least one complementarity determining region (CDR) of the V_H and/or V_L of the variable region as set forth in Tables 2 and 3, *infra*. A corresponding set of CDRs is given in Table 4, *infra*.

[0017] Accordingly, the present invention also encompasses vectors comprising said polynucleotides and host cells transformed therewith as well as their use for the production of an antibody and equivalent binding molecules which are specific for neoepitopes that are indicative and/or causative for a disorder, in particular for a disorder of the brain such as Alzheimer's disease and Parkinson disease.

[0018] The antibody, immunoglobulin chain(s), binding fragments thereof and antigen binding to said antibody can be used in pharmaceutical and diagnostic compositions for immunotherapy and diagnosis, respectively. The use of the foregoing compositions in the preparation of a medicament is however preferred.

[0019] Hence, it is a particular object of the present invention to provide methods for treating or preventing a neurological disorder characterized by abnormal accumulation and/or deposition of a protein in the central nervous system without interfering with the natural function of the respective protein. The methods comprise administering an effective concentration of an antibody or antibody derivative to the subject where the antibody binds to the pathological form of the protein or the protein deposit with a substantially higher affinity than to the normal physiological form of the protein. In a preferred embodiment, the present invention provides methods for treating or preventing or slowing the onset of diseases associated with the accumulation and deposition of the amyloid beta peptide in a subject, such as Alzheimer's disease, Down's syndrome, mild cognitive impairment, cerebral amyloid angiopathy, vascular dementia, multi-infarct dementia. The methods comprise administering an effective concentration of an antibody or antibody derivative to the subject where the antibody binds to the pathological form of the protein or the protein deposit with higher affinity than to the normal physiological form of the protein. Similar therapeutic approaches are envisaged for the treatment of Parkinson's disease, Huntington's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, cystic fibrosis, Gaucher's disease and the like.

[0020] Further embodiments of the present invention will be apparent from the description that follows.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0021] **Fig. 1:** Antibody against beta-amyloid. **A**: Human antibodies. **B**: Control staining with known antibody against human beta-amyloid. Clinically unusually stable patients

with Alzheimer's disease contain antibodies to beta-amyloid plaques. Immunohistochemical staining with antibodies from clinically unusually stable patients on brain sections obtained from patients with pathologically confirmed Alzheimer's disease reveals antibodies that bind to beta-amyloid plaques confirmed by a known antibody against human beta-amyloid.

[0022] **Fig. 2:** Antibody against neurofibrillary tangles. **A**: Human antibodies. **B**: Control staining with known antibody against human tau. Healthy human subjects contain antibodies to neurofibrillary tangles. Immunohistochemical staining with antibodies from healthy subjects on brain sections obtained from patients with pathologically confirmed Alzheimer's disease reveals antibodies that bind to neurofibrillary tangles confirmed by a known antibody against human tau.

[0023] **Fig. 3:** Antibody against dystrophic neurites. **A**: Human antibodies. **B**: Control staining with known antibody against human tau. Healthy human subjects contain antibodies to dystrophic neurites. Immunohistochemical staining with antibodies from healthy subjects on brain sections obtained from patients with pathologically confirmed Alzheimer's disease reveals antibodies that bind to dystrophic neurites.

[0024] **Fig. 4:** Antibody against beta-amyloid. The figure shows specific binding of recombinant human NI-101.11 antibody that was isolated from a clinically unusually stable Alzheimer's disease patient to brain beta-amyloid plaques. Brain sections obtained from a patient with neuropathologically confirmed Alzheimer's disease were stained with recombinant human antibody at the indicated concentrations. Antibody binding to beta-amyloid plaques with concentrations of 50 pM suggest high affinity binding.

[0025] **Fig. 5:** Binding of recombinant human NI-101.11 antibody to beta-amyloid plaques is not competed by linear synthetic N-terminal Abeta polypeptides. Binding of the recombinant antibody against brain beta-amyloid (0.5 nM) cannot be competed by N-terminal Abeta-derived polypeptide representing positions 1 to 16 at concentrations up to 1 μM.

[0026] **Fig. 6:** Recombinant human NI-101.11 antibody recognizes a conformational Abeta epitope that is not present in monomeric Abeta. Binding of NI-101.11 to beta-amyloid plaques on brain sections can be competed by Abeta1-42 fibrils but not linear synthetic Abeta1-42 monomers.

[0027] **Fig. 7:** Recombinant human NI-101.11 antibody does not bind to linear, monomeric synthetic Abeta on Western blots. Preparations of monomeric Abeta were

separated by non-denaturing PAGE. Blotted protein was probed with human recombinant antibody against beta-amyloid and control antibodies against N- terminal linear Abeta sequences (6E10). No binding of NI-101.11 to monomeric Abeta was detected. This observation suggests that the antibody recognizes a conformational Abeta epitope.

[0028] **Fig. 8:** Human NI-101.11 antibody binds artificial amyloid fibrils prepared from synthetic Abeta1-42 peptides. Synthetic Abeta fibrils or monomeric synthetic Abeta coated onto ELISA plates at equal coating densities were incubated with recombinant human antibodies against brain beta-amyloid at the indicated concentrations. Binding activity of human antibody against brain beta- amyloid to artificial amyloid fibrils (open squares) is more than 100 times higher as compared to monomeric Abeta (filled squares). Control antibody 22C4 preferentially binds to monomeric Abeta (filled cicles), and less well to fibrils (open circles). This suggests that NI-101.11 recognizes a conformational epitope which is also present on artificial amyloid fibrils prepared from synthetic Abeta peptides.

[0029] **Fig. 9:** Absent cross-reactivity of recombinant human NI-101.11 antibody to cellular full-length APP or with any of its physiological derivatives occurring in cultured cells. In contrast to the control antibody (6E10) that binds to cell-surface APP, binding of NI-101.11 to full-length APP present at cellular surfaces is absent. These data demonstrate absent cross-reactivity of NI-101.11 to physiological, cellular full-length APP.

[0030] **Fig. 10A-C:** Absence of binding of NI-101.11 to monomeric Abeta via size exclusion chromatography. Figures 10A and 10B show no binding of NI-101.11 or an unrelated control antibody to monomeric FITC-labeled Abeta1-42 while Figure 10C shows prominent binding of antibody 22C4 that recognizes a linear epitope present in the C-terminus of Abeta.

[0031] **Fig. 11:** Competition ELISA showing that binding of antibody 6E10, an antibody directed against a linear epitope at the N-terminus of Abeta could be completely blocked upon pre-incubation with excess concentrations of monomeric Abeta peptides while pre-incubation with excess concentrations of these monomeric Abeta peptide preparations did not abolish NI-101.11 binding.

[0032] **Fig. 12:** Binding of NI-101.13A and NI-101.13B to brain sections obtained from Tg2676 transgenic mouse model of Alzheimer's disease.

[0033] **Fig. 13:** ELISA showing preferential binding of NI-101.13A and NI-101.13B to artificial amyloid fibrils as compared to monomeric Abeta.

[0034] **Fig. 14A-B:** Figure 14A shows the binding of recombinant NI-101.12 to synthetic Abeta1-42 peptide via ELISA. Figure 14B shows NI-101.12 binding was competed by excess Abeta1-42 peptide.

[0035] **Fig. 15:** Recombinant human NI-101.11 antibody against brain beta-amyloid crosses the blood brain barrier in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, and binds to brain beta-amyloid plaques *in vivo*.

[0036] **Fig. 16A-B:** Recombinant human NI-101.11 antibody improves abnormal cognitive behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 24 months old arcAbeta mice were treated weekly i.p. with 3 mg/kg antibody for 2 months. Y-maze behavioral testing was performed before and after completion of the treatment.

[0037] **Fig. 17:** Blood-brain barrier penetration and decoration of amyloid plaques by peripherally administered NI-101.11. NI-101.11 can cross the blood-brain barrier and bind to beta-amyloid deposits in NI-101.11 treated mice (left panel) whereas no such staining is visible in animals treated with the human control antibody (right panel).Recombinant human NI-101.11 antibody reduces brain beta-amyloid plaque load after systemic treatment for two months.

[0038] **Fig. 18:** Passive immunization with NI-101.11 reduces beta-amyloid load in arcAbeta mice. (A, B) Thioflavin S and Congo Red plaque load analyses reveal significant reductions of more than 50% compared to the control antibody treated animals (Mann-Whitney U; p=0.02 for cortex, p=0.009 for hippocampus for ThioS and p=0.009 for cortex and p=0.04 for hippocampus for Congo Red analysis). Scale bar: 200 µm.(C-E) Thioflavin S analysis reveals a significant reduction in beta-amyloid burden (C), number of beta-amyloid plaques (D) and average plaque size (E) in NI-101.11 treated arcAbeta mice compared to control treated animals. Mann-Whitney U statistics: p=0.02 for plaque area cortex; p=0.009 for plaque area hippocampus; p=0.047 for plaque number cortex; p=0.047 for plaque number hippocampus; p=0.009 for plaque size cortex; p=0.009 for plaque number hippocampus.

[0039] **Fig. 19:** Reduced beta-amyloid load is accompanied by decreased astrocytosis and microgliosis A) Quantification of anti-GFAP staining revealed a significant reduction in the number of reactive astrocytes in the cortex of NI-101.11 treated arcAbeta mice when compared to control treated transgenics. B) Quantification of Iba-1 staining showed a trend towards a reduced number of activated microglia in NI-101.11 treated mice in cortex and hippocampus. Scale bar: 200µm.

[0040] **Fig. 20:** No increase of brain microhemorrhages after two months of treatment with recombinant human NI-101.11 antibody. 24 months old arcAbeta mice with proven massive congophilic amyloid angiopathy were treated weekly i.p. with 3 mg/kg antibody for 2 months. Representative picture of a brain microhemorrhage in arcAbeta mice revealed by Perl's Prussian blue staining (left). Quantitative analysis demonstrates a significantly elevated frequency of micorhemorrhages in arcAbeta transgenic mice compared to their wildtype littermates. Chronic treatment with NI-101.11 did not result in increased frequency of micorhemorrhages. Scale bar: 20μm

[0041] **Fig. 21:** Recombinant human NI-101.11 antibody inhibits the formation of synthetic Abeta fibrils *in vitro*. The effect of recombinant human NI-101.11 antibody on the formation of Abeta fibrils was assayed by measuring Thioflavin S bound to aggregated Abeta by fluorescence analysis.

[0042] **Fig. 22:** Antibody-mediated dose-dependent phagocytosis of FITC-Abeta1-42 fibrils by BV-2 microglial cells was measured upon inhibition of the scavenger receptor system. NI-101.11 triggers potent dose-dependent Fcgamma receptor-mediated phagocytosis of Abeta fibrils.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Definitions

[0043] It is to be noted that the term "a" or "an" entity refers to one or more of that entity; for example, "an antibody," is understood to represent one or more antibodies. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more," and "at least one" can be used interchangeably herein.

[0044] As used herein, the term "polypeptide" is intended to encompass a singular "polypeptide" as well as plural "polypeptides," and refers to a molecule composed of monomers (amino acids) linearly linked by amide bonds (also known as peptide bonds). The term "polypeptide" refers to any chain or chains of two or more amino acids, and does not refer to a specific length of the product. Thus, peptides, dipeptides, tripeptides, oligopeptides, "protein," "amino acid chain," or any other term used to refer to a chain or chains of two or more amino acids, are included within the definition of "polypeptide," and the term "polypeptide" may be used instead of, or interchangeably with any of these terms.

[0045] The term "polypeptide" is also intended to refer to the products of post-expression modifications of the polypeptide, including without limitation glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, or modification by non-naturally occurring amino acids. A polypeptide may be derived from a natural biological source or produced by recombinant technology, but is not necessarily translated from a designated nucleic acid sequence. It may be generated in any manner, including by chemical synthesis.

[0046] A polypeptide of the invention may be of a size of about 3 or more, 5 or more, 10 or more, 20 or more, 25 or more, 50 or more, 75 or more, 100 or more, 200 or more, 500 or more, 1,000 or more, or 2,000 or more amino acids. Polypeptides may have a defined three-dimensional structure, although they do not necessarily have such structure. Polypeptides with a defined three-dimensional structure are referred to as folded, and polypeptides which do not possess a defined three-dimensional structure, but rather can adopt a large number of different conformations, and are referred to as unfolded. As used herein, the term glycoprotein refers to a protein coupled to at least one carbohydrate moiety that is attached to the protein via an oxygen-containing or a nitrogen-containing side chain of an amino acid residue, *e.g.*, a serine residue or an asparagine residue.

[0047] By an "isolated" polypeptide or a fragment, variant, or derivative thereof is intended a polypeptide that is not in its natural milieu. No particular level of purification is required. For example, an isolated polypeptide can be removed from its native or natural environment. Recombinantly produced polypeptides and proteins expressed in host cells are considered isolated for purposed of the invention, as are native or recombinant polypeptides which have been separated, fractionated, or partially or substantially purified by any suitable technique.

[0048] Also included as polypeptides of the present invention are fragments, derivatives, analogs, or variants of the foregoing polypeptides, and any combination thereof. The terms "fragment," "variant," "derivative" and "analog" when referring to antibodies or antibody polypeptides of the present invention include any polypeptides which retain at least some of the antigen-binding properties of the corresponding native binding molecule, antibody, or polypeptide. Fragments of polypeptides of the present invention include proteolytic fragments, as well as deletion fragments, in addition to specific antibody fragments discussed elsewhere herein. Variants of antibodies and antibody polypeptides of the present invention include fragments as described above, and also polypeptides with altered

amino acid sequences due to amino acid substitutions, deletions, or insertions. Variants may occur naturally or be non-naturally occurring Non-naturally occurring variants may be produced using art-known mutagenesis techniques. Variant polypeptides may comprise conservative or non-conservative amino acid substitutions, deletions or additions. Derivatives of neoepitope-specific binding molecules, *e.g.*, antibodies and antibody polypeptides of the present invention, are polypeptides which have been altered so as to exhibit additional features not found on the native polypeptide. Examples include fusion proteins. Variant polypeptides may also be referred to herein as "polypeptide analogs." As used herein a "derivative" of a binding molecule or fragment thereof, an antibody, or an antibody polypeptide refers to a subject polypeptide having one or more residues chemically derivatized by reaction of a functional side group. Also included as "derivatives" are those peptides which contain one or more naturally occurring amino acid derivatives of the twenty standard amino acids. For example, 4-hydroxyproline may be substituted for proline; 5-hydroxylysine may be substituted for lysine; 3-methylhistidine may be substituted for histidine; homoserine may be substituted for serine; and ornithine may be substituted for lysine.

[0049] The term "polynucleotide" is intended to encompass a singular nucleic acid as well as plural nucleic acids, and refers to an isolated nucleic acid molecule or construct, *e.g.*, messenger RNA (mRNA) or plasmid DNA (pDNA). A polynucleotide may comprise a conventional phosphodiester bond or a non-conventional bond (*e.g.*, an amide bond, such as found in peptide nucleic acids (PNA)). The term "nucleic acid" refer to any one or more nucleic acid segments, *e.g.*, DNA or RNA fragments, present in a polynucleotide. By "isolated" nucleic acid or polynucleotide is intended a nucleic acid molecule, DNA or RNA, which has been removed from its native environment. For example, a recombinant polynucleotide encoding an antibody contained in a vector is considered isolated for the purposes of the present invention. Further examples of an isolated polynucleotide include recombinant polynucleotides maintained in heterologous host cells or purified (partially or substantially) polynucleotides in solution. Isolated RNA molecules include *in vivo* or *in vitro* RNA transcripts of polynucleotides of the present invention. Isolated polynucleotides or nucleic acids according to the present invention further include such molecules produced synthetically. In addition, polynucleotide or a nucleic acid may be or may include a regulatory element such as a promoter, ribosome binding site, or a transcription terminator.

[0050] As used herein, a "coding region" is a portion of nucleic acid which consists of codons translated into amino acids. Although a "stop codon" (TAG, TGA, or TAA) is not translated into an amino acid, it may be considered to be part of a coding region, but any flanking sequences, for example promoters, ribosome binding sites, transcriptional terminators, introns, and the like, are not part of a coding region. Two or more coding regions of the present invention can be present in a single polynucleotide construct, *e.g.*, on a single vector, or in separate polynucleotide constructs, *e.g.*, on separate (different) vectors. Furthermore, any vector may contain a single coding region, or may comprise two or more coding regions, *e.g.*, a single vector may separately encode an immunoglobulin heavy chain variable region and an immunoglobulin light chain variable region. In addition, a vector, polynucleotide, or nucleic acid of the invention may encode heterologous coding regions, either fused or unfused to a nucleic acid encoding a binding molecule, an antibody, or fragment, variant, or derivative thereof. Heterologous coding regions include without limitation specialized elements or motifs, such as a secretory signal peptide or a heterologous functional domain.

[0051] In certain embodiments, the polynucleotide or nucleic acid is DNA. In the case of DNA, a polynucleotide comprising a nucleic acid which encodes a polypeptide normally may include a promoter and/or other transcription or translation control elements operably associated with one or more coding regions. An operable association is when a coding region for a gene product, *e.g.*, a polypeptide, is associated with one or more regulatory sequences in such a way as to place expression of the gene product under the influence or control of the regulatory sequence(s). Two DNA fragments (such as a polypeptide coding region and a promoter associated therewith) are "operably associated" if induction of promoter function results in the transcription of mRNA encoding the desired gene product and if the nature of the linkage between the two DNA fragments does not interfere with the ability of the expression regulatory sequences to direct the expression of the gene product or interfere with the ability of the DNA template to be transcribed. Thus, a promoter region would be operably associated with a nucleic acid encoding a polypeptide if the promoter was capable of effecting transcription of that nucleic acid. The promoter may be a cell-specific promoter that directs substantial transcription of the DNA only in predetermined cells. Other transcription control elements, besides a promoter, for example enhancers, operators, repressors, and transcription termination signals, can be operably

associated with the polynucleotide to direct cell-specific transcription. Suitable promoters and other transcription control regions are disclosed herein.

[0052] A variety of transcription control regions are known to those skilled in the art. These include, without limitation, transcription control regions which function in vertebrate cells, such as, but not limited to, promoter and enhancer segments from cytomegaloviruses (the immediate early promoter, in conjunction with intron-A), simian virus 40 (the early promoter), and retroviruses (such as Rous sarcoma virus). Other transcription control regions include those derived from vertebrate genes such as actin, heat shock protein, bovine growth hormone and rabbit ß-globin, as well as other sequences capable of controlling gene expression in eukaryotic cells. Additional suitable transcription control regions include tissue-specific promoters and enhancers as well as lymphokine-inducible promoters (*e.g.*, promoters inducible by interferons or interleukins).

[0053] Similarly, a variety of translation control elements are known to those of ordinary skill in the art. These include, but are not limited to ribosome binding sites, translation initiation and termination codons, and elements derived from picornaviruses (particularly an internal ribosome entry site, or IRES, also referred to as a CITE sequence).

[0054] In other embodiments, a polynucleotide of the present invention is RNA, for example, in the form of messenger RNA (mRNA).

[0055] Polynucleotide and nucleic acid coding regions of the present invention may be associated with additional coding regions which encode secretory or signal peptides, which direct the secretion of a polypeptide encoded by a polynucleotide of the present invention. According to the signal hypothesis, proteins secreted by mammalian cells have a signal peptide or secretory leader sequence which is cleaved from the mature protein once export of the growing protein chain across the rough endoplasmic reticulum has been initiated. Those of ordinary skill in the art are aware that polypeptides secreted by vertebrate cells generally have a signal peptide fused to the N-terminus of the polypeptide, which is cleaved from the complete or "full length" polypeptide to produce a secreted or "mature" form of the polypeptide. In certain embodiments, the native signal peptide, *e.g.*, an immunoglobulin heavy chain or light chain signal peptide is used, or a functional derivative of that sequence that retains the ability to direct the secretion of the polypeptide that is operably associated with it. Alternatively, a heterologous mammalian signal peptide, or a functional derivative thereof, may be used. For example, the wild-type leader sequence

may be substituted with the leader sequence of human tissue plasminogen activator (TPA) or mouse ß-glucuronidase.

[0056] Unless stated otherwise, the terms "disorder" and "disease" are used interchangeably herein. A "binding molecule" as used in the context of the present invention relates primarily to antibodies, and fragments thereof, but may also refer to other non-antibody molecules that bind to a neoepitope including but not limited to hormones, receptors, ligands, major histocompatibility complex (MHC) molecules, chaperones such as heat shock proteins (HSPs) as well as cell-cell adhesion molecules such as members of the cadherin, intergrin, C-type lectin and immunoglobulin (Ig) superfamilies. Thus, for the sake of clarity only and without restricting the scope of the present invention most of the following embodiments are discussed with respect to antibodies and antibody-like molecules which represent the preferred binding molecules for the development of therapeutic and diagnostic agents.

[0057] The terms "antibody" and "immunoglobulin" are used interchangeably herein. An antibody or immunoglobulin is an antigen-binding molecule which comprises at least the variable domain of a heavy chain, and normally comprises at least the variable domains of a heavy chain and a light chain. Basic immunoglobulin structures in vertebrate systems are relatively well understood. See, *e.g.*, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

[0058] As will be discussed in more detail below, the term "immunoglobulin" comprises various broad classes of polypeptides that can be distinguished biochemically. Those skilled in the art will appreciate that heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or epsilon, (γ, μ, α, δ, ε) with some subclasses among them (*e.g.*, γ1-γ4). It is the nature of this chain that determines the "class" of the antibody as IgG, IgM, IgA IgG, or IgE, respectively. The immunoglobulin subclasses (isotypes) *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. are well characterized and are known to confer functional specialization. Modified versions of each of these classes and isotypes are readily discernable to the skilled artisan in view of the instant disclosure and, accordingly, are within the scope of the instant invention. All immunoglobulin classes are clearly within the scope of the present invention, the following discussion will generally be directed to the IgG class of immunoglobulin molecules. With regard to IgG, a standard immunoglobulin molecule comprises two identical light chain polypeptides of molecular weight approximately

23,000 Daltons, and two identical heavy chain polypeptides of molecular weight 53,000-70,000. The four chains are typically joined by disulfide bonds in a "Y" configuration wherein the light chains bracket the heavy chains starting at the mouth of the "Y" and continuing through the variable region.

[0059] Light chains are classified as either kappa or lambda (κ, λ). Each heavy chain class may be bound with either a kappa or lambda light chain. In general, the light and heavy chains are covalently bonded to each other, and the "tail" portions of the two heavy chains are bonded to each other by covalent disulfide linkages or non-covalent linkages when the immunoglobulins are generated either by hybridomas, B cells or genetically engineered host cells. In the heavy chain, the amino acid sequences run from an N-terminus at the forked ends of the Y configuration to the C-terminus at the bottom of each chain.

[0060] Both the light and heavy chains are divided into regions of structural and functional homology. The terms "constant" and "variable" are used functionally. In this regard, it will be appreciated that the variable domains of both the light (VL) and heavy (VH) chain portions determine antigen recognition and specificity. Conversely, the constant domains of the light chain (CL) and the heavy chain (CH1, CH2 or CH3) confer important biological properties such as secretion, transplacental mobility, Fc receptor binding, complement binding, and the like. By convention the numbering of the constant region domains increases as they become more distal from the antigen binding site or amino-terminus of the antibody. The N-terminal portion is a variable region and at the C-terminal portion is a constant region; the CH3 and CL domains actually comprise the carboxy-terminus of the heavy and light chain, respectively.

[0061] As indicated above, the variable region allows the antibody to selectively recognize and specifically bind epitopes on antigens. That is, the VL domain and VH domain, or subset of the complementarity determining regions (CDRs), of an antibody combine to form the variable region that defines a three dimensional antigen binding site. This quaternary antibody structure forms the antigen binding site present at the end of each arm of the Y. More specifically, the antigen binding site is defined by three CDRs on each of the VH and VL chains. Any antibody or immunoglobulin fragment which contains sufficient structure to specifically bind to an antigen is denoted herein interchangeably as an "antigen binding fragment" or an "immunospecific fragment."

[0062] In naturally occurring antibodies, the six "complementarity determining regions" or "CDRs" present in each antigen binding domain are short, non-contiguous sequences of amino acids that are specifically positioned to form the antigen binding domain as the antibody assumes its three dimensional configuration in an aqueous environment. The remainder of the amino acids in the antigen binding domains, referred to as "framework" regions, show less inter-molecular variability. The framework regions largely adopt a β-sheet conformation and the CDRs form loops which connect, and in some cases form part of, the β-sheet structure. Thus, framework regions act to form a scaffold that provides for positioning the CDRs in correct orientation by inter-chain, non-covalent interactions. The antigen binding domain formed by the positioned CDRs defines a surface complementary to the epitope on the immunoreactive antigen. This complementary surface promotes the non-covalent binding of the antibody to its cognate epitope. The amino acids comprising the CDRs and the framework regions, respectively, can be readily identified for any given heavy or light chain variable region by one of ordinary skill in the art, since they have been precisely defined (see, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); and Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol., 196*:901-917 (1987), which are incorporated herein by reference in their entireties).

[0063] In the case where there are two or more definitions of a term which is used and/or accepted within the art, the definition of the term as used herein is intended to include all such meanings unless explicitly stated to the contrary. A specific example is the use of the term "complementarity determining region" ("CDR") to describe the non-contiguous antigen combining sites found within the variable region of both heavy and light chain polypeptides. This particular region has been described by Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) and by Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol. 196*:901-917 (1987), which are incorporated herein by reference, where the definitions include overlapping or subsets of amino acid residues when compared against each other. Nevertheless, application of either definition to refer to a CDR of an antibody or variants thereof is intended to be within the scope of the term as defined and used herein. The appropriate amino acid residues which encompass the CDRs as defined by each of the above cited references are set forth below in Table I as a comparison. The exact residue numbers which encompass a particular CDR will vary depending on the sequence and size of the CDR. Those skilled in the art can routinely

determine which residues comprise a particular CDR given the variable region amino acid sequence of the antibody.

Table 1: CDR Definitions[1]

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1]Numbering of all CDR definitions in Table 1 is according to the numbering conventions set forth by Kabat *et al.* (see below).

[0064] Kabat *et al.* also defined a numbering system for variable domain sequences that is applicable to any antibody. One of ordinary skill in the art can unambiguously assign this system of "Kabat numbering" to any variable domain sequence, without reliance on any experimental data beyond the sequence itself. As used herein, "Kabat numbering" refers to the numbering system set forth by Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Unless otherwise specified, references to the numbering of specific amino acid residue positions in an antibody or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof of the present invention are according to the Kabat numbering system.

[0065] Antibodies or antigen-binding fragments, immunospecific fragments, variants, or derivatives thereof of the invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, multispecific, human, humanized, primatized, or chimeric antibodies, single chain antibodies, epitope-binding fragments, *e.g.*, Fab, Fab' and $F(ab')_2$, Fd, Fvs, single-chain Fvs (scFv), single-chain antibodies, disulfide-linked Fvs (sdFv), fragments comprising either a VL or VH domain, fragments produced by a Fab expression library, and anti-idiotypic (anti-Id) antibodies (including, *e.g.*, anti-Id antibodies to antibodies disclosed herein). ScFv molecules are known in the art and are described, *e.g.*, in US patent 5,892,019. Immunoglobulin or antibody molecules of the invention can be of any type (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, and IgY), class (*e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) or subclass of immunoglobulin molecule.

[0066] In one embodiment, the antibody of the present invention is not IgM or a derivative thereof with a pentavalent structure. Particular, in specific applications of the present invention, especially therapeutic use, IgMs are less useful than IgG and other bivalent antibodies or corresponding binding molecules since IgMs due to their pentavalent structure and lack of affinity maturation often show unspecific cross-reactivities and very low affinity.

[0067] Antibody fragments, including single-chain antibodies, may comprise the variable region(s) alone or in combination with the entirety or a portion of the following: hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. Also included in the invention are antigen-binding fragments also comprising any combination of variable region(s) with a hinge region, CH1, CH2, and CH3 domains. Antibodies or immunospecific fragments thereof of the present invention may be from any animal origin including birds and mammals. Preferably, the antibodies are human, murine, donkey, rabbit, goat, guinea pig, camel, llama, horse, or chicken antibodies. In another embodiment, the variable region may be condricthoid in origin (*e.g.*, from sharks). As used herein, "human" antibodies include antibodies having the amino acid sequence of a human immunoglobulin and include antibodies isolated from human patients, human immunoglobulin libraries or from animals transgenic for one or more human immunoglobulins and that do not express endogenous immunoglobulins, as described *infra* and, for example in, U.S. Pat. No. 5,939,598 by Kucherlapati *et al.* A human antibody is still "human" even if amino acid substitutions are made in the antibody, *e.g.*, to improve binding characteristics.

[0068] As used herein, the term "heavy chain portion" includes amino acid sequences derived from an immunoglobulin heavy chain. A polypeptide comprising a heavy chain portion comprises at least one of: a CH1 domain, a hinge (*e.g.*, upper, middle, and/or lower hinge region) domain, a CH2 domain, a CH3 domain, or a variant or fragment thereof. For example, a binding polypeptide for use in the invention may comprise a polypeptide chain comprising a CH1 domain; a polypeptide chain comprising a CH1 domain, at least a portion of a hinge domain, and a CH2 domain; a polypeptide chain comprising a CH1 domain and a CH3 domain; a polypeptide chain comprising a CH1 domain, at least a portion of a hinge domain, and a CH3 domain, or a polypeptide chain comprising a CH1 domain, at least a portion of a hinge domain, a CH2 domain, and a CH3 domain. In another embodiment, a polypeptide of the invention comprises a polypeptide chain comprising a CH3 domain. Further, a binding polypeptide for use in the invention may lack at least a

portion of a CH2 domain (*e.g.*, all or part of a CH2 domain). As set forth above, it will be understood by one of ordinary skill in the art that these domains (*e.g.*, the heavy chain portions) may be modified such that they vary in amino acid sequence from the naturally occurring immunoglobulin molecule.

[0069] In certain antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof disclosed herein, the heavy chain portions of one polypeptide chain of a multimer are identical to those on a second polypeptide chain of the multimer. Alternatively, heavy chain portion-containing monomers of the invention are not identical. For example, each monomer may comprise a different target binding site, forming, for example, a bispecific antibody.

[0070] The heavy chain portions of a binding polypeptide for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein may be derived from different immunoglobulin molecules. For example, a heavy chain portion of a polypeptide may comprise a CH1 domain derived from an IgG1 molecule and a hinge region derived from an IgG3 molecule. In another example, a heavy chain portion can comprise a hinge region derived, in part, from an IgG1 molecule and, in part, from an IgG3 molecule. In another example, a heavy chain portion can comprise a chimeric hinge derived, in part, from an IgG1 molecule and, in part, from an IgG4 molecule.

[0071] As used herein, the term "light chain portion" includes amino acid sequences derived from an immunoglobulin light chain. Preferably, the light chain portion comprises at least one of a VL or CL domain.

[0072] The minimum size of a peptide or polypeptide epitope for an antibody is thought to be about four to five amino acids. Peptide or polypeptide epitopes preferably contain at least seven, more preferably at least nine and most preferably between at least about 15 to about 30 amino acids. Since a CDR can recognize an antigenic peptide or polypeptide in its tertiary form, the amino acids comprising an epitope need not be contiguous, and in some cases, may not even be on the same peptide chain. In the present invention, peptide or polypeptide epitope recognized by antibodies of the present invention contains a sequence of at least 4, at least 5, at least 6, at least 7, more preferably at least 8, at least 9, at least 10, at least 15, at least 20, at least 25, or between about 15 to about 30 contiguous or non-contiguous amino acids of Aβ.

[0073] The term "neoepitope" in accordance with the present invention denotes an epitope which is unique for a disease pattern and contained in or formed by a disorder-associated

protein which is a pathological variant from an otherwise non-pathological protein and/or deviating from the physiology of the healthy state. Said pathophysiological variants can be formed by means of pathologically altered transcription, pathologically altered translation, post-translational modification, pathologically altered proteolytic processing, pathologically altered complex formation with physiological or pathophysiological interaction partners or cellular structures in the sense of an altered co-localization, or pathologically altered structural conformation – like for example aggregation, oligomerization or fibrillation – whose three- or four-dimensional structure differs from the structure of the physiologically active molecule. Moreover, a pathophysiological variant can also be characterized in that it is not located in its usual physiological environment or subcellular compartment. As an example, neoepitopes may be located in the pathologically conspicuous structures in the areas of brain tissues that obviously experience or have already experienced functional damage. Whether a given structure, for example cell or tissue, or protein displays a neoepitope can be verified by reversing the method described below for isolating and characterizing a disorder-associated protein specific binding molecule in that a binding molecule, for example antibody identified by said method is used to screen a sample for binding to the antibody, thereby determining the presence of a neoepitope.

[0074] The phrases "disease-associated protein specific" and "neoepitope specific" are used interchangeably herein with the term "specifically recognizing a neoepitope". As used herein terms such as "absence of cross-reactivity", "specific," " specifically recognizing," "specifically binding," "preferentially binding," and the like refer to the binding molecule's ability to discriminate between the neoepitope of a disorder-associated protein and the native protein in its wild type form and natural context. Thus, the binding molecule of the present invention has a preferential binding affinity to the neoepitope over the native protein antigen by a factor of at least two, preferably at least 5, usually more than by a factor of 10, particularly preferred by a factor of 50 and even more preferred higher than 100. Furthermore, the relative K_D of the binding molecule, *e.g.*, antibody for the specific target epitope, *e.g.* neoepitope is preferably at least 10-fold less, more preferably at least 100-fold less or more than the K_D for binding that antibody to other ligands or to the native counterpart of the disease-associated protein.

[0075] By "specifically binds," or "specifically recognizes," used interchangeably herein, it is generally meant that a binding molecule, *e.g.*, an antibody binds to an epitope via its

antigen binding domain, and that the binding entails some complementarity between the antigen binding domain and the epitope. According to this definition, an antibody is said to "specifically bind" to an epitope when it binds to that epitope, via its antigen binding domain more readily than it would bind to a random, unrelated epitope. The term "specificity" is used herein to qualify the relative affinity by which a certain antibody binds to a certain epitope. For example, antibody "A" may be deemed to have a higher specificity for a given epitope than antibody "B," or antibody "A" may be said to bind to epitope "C" with a higher specificity than it has for related epitope "D."

[0076] By "preferentially binds," it is meant that the binding molecule, *e.g.*, antibody specifically binds to an epitope more readily than it would bind to a related, similar, homologous, or analogous epitope. Thus, an antibody which "preferentially binds" to a given epitope would more likely bind to that epitope than to a related epitope, even though such an antibody may cross-react with the related epitope.

[0077] By way of non-limiting example, a binding molecule, *e.g.*, an antibody may be considered to bind a first epitope preferentially if it binds said first epitope with a dissociation constant (K_D) that is less than the antibody's K_D for the second epitope. In another non-limiting example, an antibody may be considered to bind a first antigen preferentially if it binds the first epitope with an affinity that is at least one order of magnitude less than the antibody's K_D for the second epitope. In another non-limiting example, an antibody may be considered to bind a first epitope preferentially if it binds the first epitope with an affinity that is at least two orders of magnitude less than the antibody's K_D for the second epitope.

[0078] In another non-limiting example, a binding molecule, *e.g.*, an antibody may be considered to bind a first epitope preferentially if it binds the first epitope with an off rate (k(off)) that is less than the antibody's k(off) for the second epitope. In another non-limiting example, an antibody may be considered to bind a first epitope preferentially if it binds the first epitope with an affinity that is at least one order of magnitude less than the antibody's k(off) for the second epitope. In another non-limiting example, an antibody may be considered to bind a first epitope preferentially if it binds the first epitope with an affinity that is at least two orders of magnitude less than the antibody's k(off) for the second epitope.

[0079] A binding molecule, *e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment, variant, or derivative disclosed herein may be said to bind a target polypeptide disclosed herein or a

fragment or variant thereof with an off rate (k(off)) of less than or equal to 5 X 10^{-2} sec^{-1}, 10^{-2} sec^{-1}, 5 X 10^{-3} sec^{-1} or 10^{-3} sec^{-1}. More preferably, an antibody of the invention may be said to bind a target polypeptide disclosed herein or a fragment or variant thereof with an off rate (k(off)) less than or equal to 5 X 10^{-4} sec^{-1}, 10^{-4} sec^{-1}, 5 X 10^{-5} sec^{-1}, or 10^{-5} sec^{-1} 5 X 10^{-6} sec^{-1}, 10^{-6} sec^{-1}, 5 X 10^{-7} sec^{-1} or 10^{-7} sec^{-1}.

[0080] A binding molecule, *e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment, variant, or derivative disclosed herein may be said to bind a target polypeptide disclosed herein or a fragment or variant thereof with an on rate (k(on)) of greater than or equal to 10^3 M^{-1} sec^{-1}, 5 X 10^3 M^{-1} sec^{-1}, 10^4 M^{-1} sec^{-1} or 5 X 10^4 M^{-1} sec^{-1}. More preferably, an antibody of the invention may be said to bind a target polypeptide disclosed herein or a fragment or variant thereof with an on rate (k(on)) greater than or equal to 10^5 M^{-1} sec^{-1}, 5 X 10^5 M^{-1} sec^{-1}, 10^6 M^{-1} sec^{-1}, or 5 X 10^6 M^{-1} sec^{-1} or 10^7 M^{-1} sec^{-1}.

[0081] A binding molecule, *e.g.*, an antibody is said to competitively inhibit binding of a reference antibody to a given epitope if it preferentially binds to that epitope to the extent that it blocks, to some degree, binding of the reference antibody to the epitope. Competitive inhibition may be determined by any method known in the art, for example, competition ELISA assays. An antibody may be said to competitively inhibit binding of the reference antibody to a given epitope by at least 90%, at least 80%, at least 70%, at least 60%, or at least 50%.

[0082] As used herein, the term "affinity" refers to a measure of the strength of the binding of an individual epitope with the CDR of a binding molecule, *e.g.*, an immunoglobulin molecule. *See, e.g.*, Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) at pages 27-28. As used herein, the term "avidity" refers to the overall stability of the complex between a population of immunoglobulins and an antigen, that is, the functional combining strength of an immunoglobulin mixture with the antigen. *See, e.g.*, Harlow at pages 29-34. Avidity is related to both the affinity of individual immunoglobulin molecules in the population with specific epitopes, and also the valencies of the immunoglobulins and the antigen. For example, the interaction between a bivalent monoclonal antibody and an antigen with a highly repeating epitope structure, such as a polymer, would be one of high avidity.

[0083] Binding molecules, *e.g.*, antibodies or antigen-binding fragments, variants or derivatives thereof of the invention may also be described or specified in terms of their cross-reactivity. As used herein, the term "cross-reactivity" refers to the ability of an

antibody, specific for one antigen, to react with a second antigen; a measure of relatedness between two different antigenic substances. Thus, an antibody is cross reactive if it binds to an epitope other than the one that induced its formation. The cross reactive epitope generally contains many of the same complementary structural features as the inducing epitope, and in some cases, may actually fit better than the original.

[0084] For example, certain antibodies have some degree of cross-reactivity, in that they bind related, but non-identical epitopes, *e.g.*, epitopes with at least 95%, at least 90%, at least 85%, at least 80%, at least 75%, at least 70%, at least 65%, at least 60%, at least 55%, and at least 50% identity (as calculated using methods known in the art and described herein) to a reference epitope. An antibody may be said to have little or no cross-reactivity if it does not bind epitopes with less than 95%, less than 90%, less than 85%, less than 80%, less than 75%, less than 70%, less than 65%, less than 60%, less than 55%, and less than 50% identity (as calculated using methods known in the art and described herein) to a reference epitope. An antibody may be deemed "highly specific" for a certain epitope, if it does not bind any other analog, ortholog, or homolog of that epitope.

[0085] Binding molecules, *e.g.*, antibodies or antigen-binding fragments, variants or derivatives thereof of the invention may also be described or specified in terms of their binding affinity to a polypeptide of the invention. Preferred binding affinities include those with a dissociation constant or Kd less than 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, or 10^{-15} M.

[0086] As previously indicated, the subunit structures and three dimensional configuration of the constant regions of the various immunoglobulin classes are well known. As used herein, the term "VH domain" includes the amino terminal variable domain of an immunoglobulin heavy chain and the term "CH1 domain" includes the first (most amino terminal) constant region domain of an immunoglobulin heavy chain. The CH1 domain is adjacent to the VH domain and is amino terminal to the hinge region of an immunoglobulin heavy chain molecule.

[0087] As used herein the term "CH2 domain" includes the portion of a heavy chain molecule that extends, *e.g.*, from about residue 244 to residue 360 of an antibody using conventional numbering schemes (residues 244 to 360, Kabat numbering system; and residues 231-340, EU numbering system; see Kabat EA *et al. op. cit.* The CH2 domain is

unique in that it is not closely paired with another domain. Rather, two N-linked branched carbohydrate chains are interposed between the two CH2 domains of an intact native IgG molecule. It is also well documented that the CH3 domain extends from the CH2 domain to the C-terminal of the IgG molecule and comprises approximately 108 residues.

[0088] As used herein, the term "hinge region" includes the portion of a heavy chain molecule that joins the CH1 domain to the CH2 domain. This hinge region comprises approximately 25 residues and is flexible, thus allowing the two N-terminal antigen binding regions to move independently. Hinge regions can be subdivided into three distinct domains: upper, middle, and lower hinge domains (Roux *et al.*, *J. Immunol. 161*:4083 (1998)).

[0089] As used herein the term "disulfide bond" includes the covalent bond formed between two sulfur atoms. The amino acid cysteine comprises a thiol group that can form a disulfide bond or bridge with a second thiol group. In most naturally occurring IgG molecules, the CH1 and CL regions are linked by a disulfide bond and the two heavy chains are linked by two disulfide bonds at positions corresponding to 239 and 242 using the Kabat numbering system (position 226 or 229, EU numbering system).

[0090] As used herein, the term "engineered antibody" refers to an antibody in which the variable domain in either the heavy and light chain or both is altered by at least partial replacement of one or more CDRs from an antibody of known specificity and, if necessary, by partial framework region replacement and sequence changing. Although the CDRs may be derived from an antibody of the same class or even subclass as the antibody from which the framework regions are derived, it is envisaged that the CDRs will be derived from an antibody of different class and preferably from an antibody from a different species. An engineered antibody in which one or more "donor" CDRs from a non-human antibody of known specificity is grafted into a human heavy or light chain framework region is referred to herein as a "humanized antibody." It may not be necessary to replace all of the CDRs with the complete CDRs from the donor variable region to transfer the antigen binding capacity of one variable domain to another. Rather, it may only be necessary to transfer those residues that are necessary to maintain the activity of the target binding site. Given the explanations set forth in, *e.g.*, U. S. Pat. Nos. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, and 6,180,370, it will be well within the competence of those skilled in the art, either by carrying out routine experimentation or by trial and error testing to obtain a functional engineered or humanized antibody.

[0091] As used herein the term "properly folded polypeptide" includes polypeptides in which all of the functional domains comprising the polypeptide are distinctly active. As used herein, the term "improperly folded polypeptide" includes polypeptides in which at least one of the functional domains of the polypeptide is not active. In one embodiment, a properly folded polypeptide comprises polypeptide chains linked by at least one disulfide bond and, conversely, an improperly folded polypeptide comprises polypeptide chains not linked by at least one disulfide bond.

[0092] As used herein the term "engineered" includes manipulation of nucleic acid or polypeptide molecules by synthetic means (*e.g.* by recombinant techniques, *in vitro* peptide synthesis, by enzymatic or chemical coupling of peptides or some combination of these techniques).

[0093] As used herein, the terms "linked," "fused" or "fusion" are used interchangeably. These terms refer to the joining together of two more elements or components, by whatever means including chemical conjugation or recombinant means. An "in-frame fusion" refers to the joining of two or more polynucleotide open reading frames (ORFs) to form a continuous longer ORF, in a manner that maintains the correct translational reading frame of the original ORFs. Thus, a recombinant fusion protein is a single protein containing two ore more segments that correspond to polypeptides encoded by the original ORFs (which segments are not normally so joined in nature.) Although the reading frame is thus made continuous throughout the fused segments, the segments may be physically or spatially separated by, for example, in-frame linker sequence. For example, polynucleotides encoding the CDRs of an immunoglobulin variable region may be fused, in-frame, but be separated by a polynucleotide encoding at least one immunoglobulin framework region or additional CDR regions, as long as the "fused" CDRs are co-translated as part of a continuous polypeptide.

[0094] In the context of polypeptides, a "linear sequence" or a "sequence" is an order of amino acids in a polypeptide in an amino to carboxyl terminal direction in which residues that neighbor each other in the sequence are contiguous in the primary structure of the polypeptide.

[0095] The term "expression" as used herein refers to a process by which a gene produces a biochemical, for example, an RNA or polypeptide. The process includes any manifestation of the functional presence of the gene within the cell including, without limitation, gene knockdown as well as both transient expression and stable expression. It includes without

limitation transcription of the gene into messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), small hairpin RNA (shRNA), small interfering RNA (siRNA) or any other RNA product, and the translation of such mRNA into polypeptide(s). If the final desired product is a biochemical, expression includes the creation of that biochemical and any precursors. Expression of a gene produces a "gene product." As used herein, a gene product can be either a nucleic acid, *e.g.*, a messenger RNA produced by transcription of a gene, or a polypeptide which is translated from a transcript. Gene products described herein further include nucleic acids with post transcriptional modifications, *e.g.*, polyadenylation, or polypeptides with post translational modifications, *e.g.*, methylation, glycosylation, the addition of lipids, association with other protein subunits, proteolytic cleavage, and the like.

[0096] As used herein, the terms "treat" or "treatment" refer to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) an undesired physiological change or disorder, such as the development or spread of cancer. Beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, alleviation of symptoms, diminishment of extent of disease, stabilized (*i.e.*, not worsening) state of disease, delay or slowing of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission (whether partial or total), whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as compared to expected survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the condition or disorder as well as those prone to have the condition or disorder or those in which the manifestation of the condition or disorder is to be prevented.

[0097] By "subject" or "individual" or "animal" or "patient" or „mammal," is meant any subject, particularly a mammalian subject, *e.g.*, a human patient, for whom diagnosis, prognosis, prevention, or therapy is desired.

II. Methods to Identify Binding Molecules

[0098] The present invention generally relates to means and methods for discovering therapeutically efficient antibodies from clinically preselected human subjects. As demonstrated in the examples, human antibodies against abnormal structures in human brain diseases can be isolated from phenotypically healthy, or clinically unusually stable patients and corresponding recombinant antibodies can be successfully used for the treatment, amelioration of pathology and prevention of impairment of brain function

without substantial side effects. Clinical stability or non-progression of disease can be identified by way of example by measurement over time of clinical, e.g., cognitive, status (by neuropsychological testing, for example); assessment of the global functional level; evaluation of the daily living capacities or behavioral deficits; volumetric analysis of brain structures; *in vivo* measurement of pathological deposits of abnormal proteins in brain (*e.g.* PET beta-amyloid imaging) or biochemical variables in body fluids (*e.g.* tau proteins, or Abeta peptides); and by comparison to the natural course/history of the disease. Thus, the present invention provides antibodies and binding molecules which are capable of recognizing neoepitopes of disease-associated proteins which derive from native endogenous proteins, and are prevalent in the body of a patient in a variant form, *e.g.* as a pathological protein and/or out of their normal physiological context. In particular, antibodies and antigen-binding fragments thereof are provided, which demonstrate the immunological binding characteristics and/or biological properties as outlined for the antibody illustrated in the Examples. Where present, the term "immunological binding characteristics," or other binding characteristics of an antibody with an antigen, in all of its grammatical forms, refers to the specificity, affinity, cross-reactivity, and other binding characteristics of an antibody. Naturally, the present invention extends to the antibody producing cell lines and recombinant cells as well. The present invention further relates to diagnostic assays and kits that comprise the binding molecule of the present invention and to therapeutic methods and therapeutic evaluations based thereon.

[0099] The present invention is based on the observation that in human subjects and patients preselected according to specific clinical criteria, who bear a risk of developing a neurological disorder like Alzheimer's disease due to their age, as related to the humoral defense, antibodies to endogenous pathophysiological variants like Abeta peptide aggregates, neurofibrillary tangles, dystrophic neurites and further cellular structures can also be found, which are neuropathologically characteristic for the disorder. These structures can be found alone or in combination with other pathological structures and can, as in case of the Abeta aggregates and the precursors of the neurofibrillary tangles, develop pathological effects. However, those antibodies specifically recognizing said structures exhibit no or significantly lower cross-reactivity to the normal physiologically functional forms of the proteins underlying the pathological structures, contrary to the known case of an autoimmune response.

[0100] Without intending to be bound by theory it is, based on the experiments performed in accordance with the present invention, believed that a disorder does not have to become manifest and phenotypically perceivable, as in case of an infection, in order to result in an experimentally measurable activity of the humoral immune system like the generation or activation of specific B cells or B memory cells. In case of tumor cells or differentiated cells, which have to be physiologically disposed of, mechanisms are already known, wherein partners like T4 helper cells and cytotoxic T cells and natural killer cells of the cellular immune system cooperate in the induction of apoptosis. It has to be assumed that, also in a healthy human, tumor cells or precursors thereof are formed on a daily basis by means of mutation. However, these are immediately driven to apoptosis by means of humoral and cellular mechanisms, so that a tumor is not detectable. In this sense, a "healthy, or clinically unusually stable, patient" is not understood to denote an individual in whom no disease events take place, but an individual in whom the diverse disease events are controlled by blocking or defense mechanisms before they phenotypically manifest themselves.

[0101] In view of the above, it was hypothesized in accordance with the present invention that it should be possible to identify an antibody or an antibody-producing cell from specific patient collectives or healthy subjects, which have been preselected according to clinical criteria, without precognition of the molecular nature of a target structure epitope, *e.g.* neoepitope, wherein the antibody, in case of already prevailing tolerance in the donor organism – which is, for example, proved by the absence of autoimmunity – could successfully be employed against a disease in form of a recombinantly produced agent. Identifying such an antibody can thus be conducted without precognition of the molecular epitope of the target structure, but rather solely by means of binding to neoepitopes of pathologically conspicuous structures in clinico-pathologically well characterized tissue sections derived from human patients or from animal models of the respective disease.

[0102] Accordingly, in a first aspect the present invention relates to a method of isolating a disorder-associated protein-specific binding molecule comprising:

[0103] (a) subjecting a sample obtained from a patient who is symptom-free, or who is clinically unusually stable, but who is affected with or at risk of developing a disorder or effectively suppressing the manifestation or outbreak of a disorder to a specimen of pathologically or physiologically altered cells or tissue of predetermined clinical characteristics; and

[0104] (b) identifying and optionally isolating a binding molecule which preferentially binds to said specimen but not or with significantly lower affinity to corresponding cells or tissues without such pathological characteristics as it may be derived from a healthy subject.

[0105] The method of the present invention can be performed as outlined in the Examples section with means well known to a person skilled in the art. For example, a liquid sample obtained from the patient can be passed through a first aperture of a duct which is in contact with the specimen target structure firmly held in an object holder, thereby allowing putative binding molecules present in the sample, either in a soluble form or expressed on the cell surface and membrane, respectively, to bind to said target structure. The liquid sample may contain for example lymphocytes and/or antibodies while the specimen may be a tissue section or a membrane coated with molecules or molecular combinations which are distinct for a pathological target structure.

[0106] Any non-binding matter can be removed via the second duct aperture. At the same time, the temperature of the object holder may be controlled by an object holder thermostat, for example at a temperature at which natural binding of the putative binding molecule to the neoepitope of the antigen specific for the specimen takes place in the human body. By way of the flowing motion, *e.g.* passing the liquid sample containing binding molecules, preferably at body temperature over the target structure natural systems of binding interactions can be simulated. However, other methods of incubating the sample with the specimen such as by means of a shaker or rotating table may be used as well. A particular advantage of the above-mentioned system is that it allows an interruption of metabolic processes at any time by decreasing the temperature of the object holder by means of the object holder thermostat. In doing so, the temperature of the object holder can be decreased to for example 2-10°C, in particular 4°C. A corresponding device that can be used in accordance with the method of the present invention is described in European patent application EP 1 069 431 A2. Hence, the method of the present invention will allow identification and characterization of the binding partners as well as at the same time to identify and characterize the molecular classes, molecular groups and/or molecular parts required for the binding process, *i.e.* the target structures of the specimen, which hitherto may be unknown. This will not only open up new possible ways of diagnosis, but will also provide a new test system for therapeutic approaches on a molecular level.

[0107] As a patient may qualify in accordance with the present invention a pool of healthy volunteers if specific surrogate markers predict a high probability of a status of a disease, which has surprisingly – and possibly due to a specific endogenous immune response – not become clinically manifest, however. In this sense, as related to diverse diseases, a healthy elderly human would be an individual, in which a neurodegenerative disease like Alzheimer's disease or Parkinson's disease is not yet clinically manifest, but in which the preclinical development of pathophysiological protein variants, *i.e.* disorder-associated proteins, and in the above-mentioned sense by means of early intervention of the humoral immune system with or without involvement of cellular components of the immune system, has been restricted or delayed to such an extent that, until the moment when the healthy, but not preclinical patient participated in the study, the clinical manifestation of the disease had not yet occurred. Preferably, inconspicuous volunteers in whom neither autoimmunological processes have been diagnosed nor other possible pathological conditions occur as side effects are recruited as donors for the sample in the first instance.

[0108] In principle samples from patients may be used, who have undergone an active immunization with variants of physiological proteins or peptides, wherein the antibody development has been boosted by the immunization. Antibodies, for example, can be identified and isolated from Alzheimer's disease patients that have been vaccinated with Abeta peptide. *See for e.g.*, Hock *et al., Nature Medicine 8*:1280-1275 (2002), Hock *et al.*, *Neuron 38*:547-554 (2003), and WO 2004/095031, each incorporated herein by reference in their entireties. However, it may be preferred to use samples from volunteers which have not received such immunization or corresponding medication concerning the disorder the variant pathological protein is associated with and/or causative of.

[0109] According to the present invention, samples of a patient, *e.g.* of individuals that have been clinically preselected are analyzed for the presence of binding molecules specifically recognizing specimen of pathologically conspicuous structures, for example in *ex vivo* tissue from clinico-pathologically characterized human patients or animal models like, for example, transgenic mice, or *in vitro* cell structures, or in pathological allogenic or xenogenic tissue. Preferably, said patient and/or as said subject providing the specimen are human, most preferably both.

[0110] The characteristic pathologically or physiologically altered sample, cell or tissue specimen is preferably displayed by optical detection after reaction with a binding molecule, *e.g.* antibody of the present invention. The specimen may be obtained as/from a

cell sample, tissue section, cellular smear test, cell or tissue sample of an animal model of a human disease or *in vitro* cultured cell and tissue material. Preferably, at least one of said specimen is present in an object holder in form of a scan positions, wherein each scan position corresponds to a specific pathological structure and at least two of the scan positions are concomitantly exposed to detection of a reaction with the antibody. By way of example, antibodies to the neuropathological hallmarks of such neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or tauopathies – including beta-amyloid plaques, Lewy bodies, neurofibrillary tangles and dystrophic neuritis can be detected on sections obtained from human post-mortem brain tissues with clinico-pathologically confirmed diagnoses of the respective disease entities. This is done by mounting small rods of paraffin embedded tissue on to glass slides which are then probed with samples of a patient or healthy donor. The detection of a reaction with the antibody is done following standard procedures of immunohistochemistry and microscopical scanning.

[0111] Multiple tissue microsections containing various human disease tissues can be assembled on the glass slide to form a multiple tissue microarray. Similarly, additional specimens from tissue samples of animal models of human disease, cellular smear or cells can be embedded in paraffin and mounted on glass slides alone or in combination with above described human post-mortem Alzheimer's disease brain tissue or tissue arrays. Thus, a single test position on the glass slide can comprise mixed arrays of tissue and other specimen displaying pathologically conspicuous structures.

[0112] In order to increase the throughput of the assay, more than one test position is mounted on a glass slide. Preferably, eight test positions are mounted onto glass slides in a two by four format fitting the 96 well or microtiter format. A more detailed description of this microtiter-compatible tissue microarray can be found *infra* in the supplementary methods section below.

[0113] As mentioned the sample to be analyzed may comprise a body fluid, a cell sample or the supernatant of a cell sample or a derivative thereof. Body fluids such as lumbar cerebrospinal fluid (CSF), plasma or urine can be collected following standard clinical procedures after informed consent of the patients. Most preferably, the sample comprises or is derived from B-cells or memory B-cells and/or comprises antibodies.

[0114] Preferably, said patient has been determined to be affected with a not yet manifested disorder or at risk to develop the disorder by the presence or absence of a surrogate marker,

or by an unusually stable disease course. Clinical criteria are to be considered in connection with surrogate markers having either an increased probability of the occurrence or the manifestation of a disease according to the present invention in the sense of a preclinical condition, or, vice versa, proving the improbability of such a disease already having occurred as, for example, a genetic constellation promoting the disease is existent or an extreme exposition or way of living renders the phenotypical development of a disease probable. In the case of Alzheimer's disease this means that, according to the present invention, such human volunteers are searched for B cells or memory B cells against neuropathology-associated protein complexes like Abeta aggregates, oligomeric Abeta species and beta-amyloid fibrils in beta-amyloid plaques, for tau filaments in neurofibrillary tangles, for alpha synuclein in Lewy bodies or components hitherto not molecularly identified that, with respect to age, belong to a group of individuals in whom either the prevalence of Alzheimer's disease is particularly high or who originate genetically from a population bearing a high risk for Alzheimer's disease. These are, for example, persons older than 75 years having no or only marginal neuropsychologically measurable cognitive impairments, or in case of tumor indications, persons having highly indicative tumor markers, for example genetic tumor markers, but not suffering from the disease (Alloul *et al.*, Arch. Gerontology Geriatrics 27 (1998), 189; Dunn *et al.*, Immunity 21 (2004) 137-148). In case of mild cognitive impairment, these are patients that have remained clinically, neuropsychologically, or cognitively stable for years in spite of their annual statistical risk of more than 20% for developing a neurodegenerative disease that is clinically manifest and progressive in the further course. Thus, in one embodiment said surrogate marker is selected from the group consisting of old age, brain amyloid load, ApoE genotype, APP genotype, PS1 genotype, levels in body fluids of Abeta peptide, isoprostanes, Tau, and phospho-Tau.

[0115] A particular approach in employing the method according to the present invention is testing samples of B cells and B memory cells from clinically preselected volunteers against arrays of specimen of pathologically conspicuous tissues of entirely different or related primary diseases. In particular, such pathological tissues originate from human patients suffering from neurodegenerative diseases, protein-misfolding diseases, tissue amyloidoses and other diseases related to pathological deposits, autoimmune disorders, inflammatory diseases, hyperproliferative and neoplastic diseases, *e.g.*, tumors, storage

diseases and inclusion diseases as well as from animal models of human diseases, in particular from mice altered with pathologically relevant human genes.

[0116] In one particularly preferred embodiment, the present invention focuses on Alzheimer's disease. In this embodiment, the sample is obtained from a subject preferably fulfilling the following criteria:

a) being 65, preferably 70 and more preferably 75 years of age or older;

b) having full cognitive capacity and good health; and

c) having no clinical signs of dementia; or

d) having unusually slow rates of progression of disease despite the presence of an established clinical diagnosis of probable Alzheimer's disease; or

e) having unusually low conversion rates from Mild Cognitive Impairment (MCI) to full blown Alzheimer's disease.

[0117] In a further embodiment, the method of the present invention further comprises the steps of:

a) purifying B cells or B memory cells from a sample which has been identified to contain binding molecules, *e.g.* antibodies which preferentially bind to said specimen but not or with significantly lower affinity to corresponding cells or tissue of a healthy subject;

b) obtaining the immunoglobulin gene repertoire encoding said antibodies from said B cells or B memory cells; and

c) using said repertoire to express said antibodies, and optionally wherein step (b) comprises the steps of:

d) obtaining mRNA from said B cells or memory B cells;

e) obtaining cDNA from the mRNA of step (iv); and

f) using a primer extension reaction to amplify from said cDNA the fragments corresponding to the heavy chains (HC) and the kappa/lambda light chains (LC) of said antibodies.

[0118] Methods of producing clones of an immortalized human B cell and B memory lymphocyte, comprising the step of transforming human B memory lymphocytes using Epstein Barr Virus (EBV) in the presence of a polyclonal B cell activator are summarized in international application WO2004/076677. This international application also describes methods for obtaining a nucleic acid sequence that encodes an antibody of interest, comprising the steps of preparing an immortalized B cell clone and obtaining/sequencing nucleic acid from the B cell clone that encodes the antibody of interest and further inserting the nucleic acid into or using the nucleic acid to prepare an expression host that can express the antibody of interest, culturing or sub-culturing the expression host under conditions where the antibody of interest is expressed and, optionally, purifying the antibody of interest. It goes without saying that the nucleic acid may be manipulated in between to introduce restriction sites, to change codon usage, and/or to add or optimize transcription and/or translation regulatory sequences. For example, nucleic acid sequences can be generated by back-translation of the polypeptide sequences of the present invention using software such as vector NTI software to generate nucleic acid sequences that are codon-optimized and optimized for RNA stability. All this techniques are state of the art and can be performed by the person skilled in the art without undue burden. Additional methods of immortalizing human B cells are well known in the art, *e.g.*, the construction of human hybridomas or human-murine chimeric hybridomas.

[0119] In a further aspect, the present invention relates to a binding molecule which is capable of selectively recognizing an epitope of a disease-associated protein including a neoepitope of a disease-associated protein, which preferably can be obtained or validated by the method of the present invention described hereinbefore and illustrated in the examples. Advantageously, the binding molecule of the present invention does not substantially recognize said protein in its non-disorder-associated form; see also *supra*.

[0120] Means and methods for the recombinant production of binding molecules, in particular antibodies and mimics thereof as well as methods of screening for competing binding molecules, which may or may not be antibodies, are known in the art and are summarized, for example, in international application WO2006/103116 with respect to antibodies against beta-amyloid and the treatment/diagnosis of Alzheimer's disease, the disclosure content of which is incorporated herein by reference for this purpose of antibody engineering and administration for therapeutic or diagnostic applications.

[0121] However, as described herein, in particular with respect to therapeutic applications in human the antibody of the present invention is a human antibody. In this context, the variant pathological protein recognized by the antibody is preferably associated with a neurological disorder, preferably a disorder of the brain.

[0122] Moreover, as demonstrated in Examples 3 to 5 the binding molecule of the present invention, in particular an antibody has several advantageous biological properties one or more of which have been accomplished by the present invention for the first time, *e.g.* it is capable of:

(i) crossing the blood brain barrier, for example at the site of the pathological event;

(ii) binding beta-amyloid plaques, cerebrovascular amyloid, diffuse Abeta deposits, neurofibrillary tangles, hyperphosphorylated tau, alpha-synuclein positive Lewy-bodies or protein aggregates associated with dystrophic neurites;

(iii) removing beta-amyloid plaques in the brain and/or preventing the formation of amyloid plaques in the brain;

(iv) substantially restoring normal behavior; and/or

(v) causing no microhemorrhages.

[0123] In a particular preferred embodiment, the antibody or equivalent binding molecule of the present invention may be distinguished from other antibodies by one or more of the following properties, *e.g.* they are able to:

1. pass, at least in small amounts, the blood-brain barrier at the site of the pathological events;

2. bind to one or more pathophysiologically relevant extracellular or cellular structure;

3. lead to reduction of the pathophysiologically relevant structure *in vitro* or *in vivo*;

4. lead to reduction of the pathophysiologically relevant structure and to the reduction of a toxicity associated therewith;

5. lead to blocking or delaying a disease process;

6. lead to regeneration of cellular and organ-specific and organismic functions and possibly to a secondary prevention of the recurrence of the original pathophysiology after degradation of the toxicity connected with the pathophysiologically relevant structure; and/or

7. is not associated with increased microhemorrhages

[0124] Furthermore, the absence of cross-reactivity with physiological precursors or derivatives leads to the consequence that, firstly, the concentrations are predictable as *sink effects* in healthy tissue structures are avoided and, secondly, that autoimmune responses in the sense of undesired side effects are substantially missing. In addition, previous reports suggested an association of cerebral amyloid angiopathy (CAA) with compromised vascular reactivity in a transgenic mouse model with CAA (Mueggler et al., J Neurosci 22 (2002), 7218-24.). The severe CAA occurring in old arcAß mice (Knobloch et al., Neurobiol. Aging 28:1297-1306 (2007) epub July 31, 2006) might thus constrain the vasodilative flexibility of affected blood vessels. In accordance with the present invention it is prudent to expect that treatment with the antibodies of the present invention can improve vasoreactivity and cerebral blood flow in aged APP transgenic mice. This may be validated by using the arcAß mice model described in Knobloch et al. (2006), supra, and disclosed in US application "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" by Grimm et al., serial number 60/934,291 filed on June 11, 2007, the disclosure content of which is incorporated herein by reference.

III. Antibodies

[0125] The present invention is further directed to the binding molecules *e.g.* antibodies and binding fragments, variants, and derivatives thereof shown in Table 2 and 3. The present invention is more specifically directed to an antibody, or antigen-binding fragment, variant or derivatives thereof, where the antibody specifically binds to the same neoepitope of a disorder-associated protein as a reference antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B.

[0126] The invention is further drawn to an antibody, or antigen-binding fragment, variant or derivatives thereof, where the antibody competitively inhibits a reference antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13,

NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B from binding to the neoepitope of a disorder-associated protein.

[0127] The invention is also drawn to an antibody, or antigen-binding fragment, variant or derivatives thereof, where the antibody comprises an antigen binding domain identical to that of an antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B.

[0128] The present invention further exemplifies several such binding molecules, *e.g.* antibodies and binding fragments thereof, which may be characterized by comprising in their variable region, *e.g.* binding domain at least one complementarity determining region (CDR) of the V_H and/or V_L variable region comprising any one of the amino acid sequences depicted in Table 2 (V_H) and Table 3 (V_L).

Table 2: Amino acid sequences of the V_H region of neoepitope specific antibodies.

Antibody	Variable heavy chain sequence
NI-101.10	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKKY YTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTT VTVSS (SEQ ID NO: 4)
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKK YYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO: 6)
NI-101.12	EVQLVESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSIRSGSICWYWIRQPPGKGLEWIGYFCYSGATFY TPSLRGRLTISVDASKNQLSLSLSSVTAADTAVYYCARRAGENSGGIEPYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 10)
NI-101.13	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 14)
NI-101.12F 6A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKK YYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO: 39)
NI-101.13A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42)
NI-101.13B	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Table 3: Amino acid sequences of the V_L region of neoepitope specific antibodies.

Antibody	Variable light chain sequence (kappa or lambda)

NI-101.10	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.12	DEIVLTQSPSSLSASIGDRVTITCRASESINKYVNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGAPSRV SGSGFGRDFSLTISGLQAEDFGAYFCQQSYSAPYTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 12)
NI-101.13	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQPPGTAPKLLIYRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG (SEQ ID NO: 16)
NI-101.12F 6A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)
NI-101.13A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 44)
NI-101.13B	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQIPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 45)

[0129] The corresponding nucleotide sequences encoding the above-identified variable regions are set forth in the attached sequence listing. An exemplary set of CDRs of the above amino acid sequences of the V_H and/or V_L region as depicted in Tables 2 and 3 are given in Table 4. However, as discussed in the following the person skilled in the art is well aware of the fact that in addition or alternatively CDRs may be used, which differ in their amino acid sequence from those set forth in Table 4 by one, two, three or even more amino acids in case of CDR2 and CDR3.

Table 4: Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of V_H and V_L regions of neoepitope specific antibodies.

Antibody	Variable heavy chain	Variable light chain
NI-101.10		
CDR1	SYGIH (SEQ ID NO: 17)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 18)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 19)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.12		
CDR1	SGSIC (SEQ ID NO: 26)	RASESINKYVN (SEQ ID NO: 29)
CDR2	WIGYFCYSGATFYTPSLRG (SEQ ID NO: 27)	AASSLQS (SEQ ID NO: 30)
CDR3	RAGENSGGIEPYYGMDV (SEQ ID NO: 28)	QQSYSAPYT (SEQ ID NO: 31)

NI-101.13		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 35)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 36)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	AAWDDSLSGYV (SEQ ID NO: 37)
NI-101.12F6A		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.13A		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 46)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	AASSLQS (SEQ ID NO: 47)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	QQSYSTRT (SEQ ID NO: 48)
NI-101.13B		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 49)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	KASSLES (SEQ ID NO: 50)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	QQYNSYSRT (SEQ ID NO: 51)

[0130] In one embodiment, the antibody of the present invention is any one of the antibodies comprising an amino acid sequence of the V_H and/or V_L region as depicted in Tables 2 and 3. Alternatively, the antibody of the present invention is an antibody or antigen-binding fragment thereof, which competes for binding to the neoeptitope with at least one of the antibodies having the V_H and/or V_L region as depicted in Tables 2 and 3. Those antibodies may be murine as well, however, humanized, xenogeneic, or chimeric human-murine antibodies being preferred, in particular for therapeutic applications. An antigen-binding fragment of the antibody can be, for example, a single chain Fv fragment (scFv), a F(ab') fragment, a F(ab) fragment, and an $F(ab')_2$ fragment. For some applications only the variable regions of the antibodies are required, which can be obtained by treating the antibody with suitable reagents so as to generate Fab', Fab, or $F(ab'')_2$ portions. Such fragments are sufficient for use, for example, in immunodiagnostic procedures involving coupling the immunospecific portions of immunoglobulins to detecting reagents such as radioisotopes.

[0131] The present invention is further directed to isolated polypeptides which make up the antibodies of the present invention. Antibodies of the present invention comprise polypeptides, *e.g.*, amino acid sequences encoding specific antigen binding regions derived from immunoglobulin molecules. A polypeptide or amino acid sequence "derived from" a

designated protein refers to the origin of the polypeptide having a certain amino acid sequence. In certain cases, the polypeptide or amino acid sequence which is derived from a particular starting polypeptide or amino acid sequence has an amino acid sequence that is essentially identical to that of the starting sequence, or a portion thereof, wherein the portion consists of at least 10-20 amino acids, at least 20-30 amino acids, at least 30-50 amino acids, or which is otherwise identifiable to one of ordinary skill in the art as having its origin in the starting sequence.

[0132] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin heavy chain variable region (VH), where at least one of VH-CDRs of the heavy chain variable region or at least two of the VH-CDRs of the heavy chain variable region are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference heavy chain VH-CDR1, VH-CDR2 or VH-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Alternatively, the VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 regions of the VH are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference heavy chain VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Thus, according to this embodiment a heavy chain variable region of the invention has VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 polypeptide sequences related to the groups shown in Table 4, *supra*. While Table 4 shows VH-CDRs defined by the Kabat system, other CDR definitions, *e.g.*, VH-CDRs defined by the Chothia system, are also included in the present invention, and can be easily identified by a person of ordinary skill in the art using the data presented in Tables 2 and 3.

[0133] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin heavy chain variable region (VH) in which the VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 regions have polypeptide sequences which are identical to the VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 groups shown in Table 4.

[0134] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin heavy chain variable region (VH) in which the VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 regions have polypeptide sequences which are identical to the VH-CDR1, VH-CDR2 and VH-CDR3 groups shown in Table 4, except for one, two, three, four, five, or six amino acid substitutions in any one VH-CDR. In certain embodiments the amino acid substitutions are conservative.

[0135] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin light chain variable region (VL), where at least one of the VL-CDRs of the light chain variable region or at least two of the VL-CDRs of the light chain variable region are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference light chain VL-CDR1, VL-CDR2 or VL-CDR3 amino acid sequences from antibodies disclosed herein. Alternatively, the VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 regions of the VL are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference light chain VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 amino acid sequences from antibodies disclosed herein. Thus, according to this embodiment a light chain variable region of the invention has VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 polypeptide sequences related to the polypeptides shown in Table 4, *supra*. While Table 4 shows VL-CDRs defined by the Kabat system, other CDR definitions, *e.g.*, VL-CDRs defined by the Chothia system, are also included in the present invention.

[0136] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin light chain variable region (VL) in which the VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 regions have polypeptide sequences which are identical to the VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 groups shown in Table 4.

[0137] In another embodiment, the present invention provides an isolated polypeptide comprising, consisting essentially of, or consisting of an immunoglobulin heavy chain variable region (VL) in which the VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 regions have polypeptide sequences which are identical to the VL-CDR1, VL-CDR2 and VL-CDR3 groups shown in Table 4, except for one, two, three, four, five, or six amino acid substitutions in any one VL-CDR. In certain embodiments the amino acid substitutions are conservative.

[0138] An immunoglobulin or its encoding cDNAs may be further modified. Thus, in a further embodiment the method of the present invention comprises any one of the step(s) of producing a chimeric antibody, humanized antibody, single-chain antibody, Fab-fragment, bi-specific antibody, fusion antibody, labeled antibody or an analog of any one of those. Corresponding methods are known to the person skilled in the art and are described, *e.g.*, in Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. When derivatives of said antibodies are obtained by the phage display technique, surface plasmon resonance as employed in the BIAcore system can be used to increase the

efficiency of phage antibodies which bind to the same epitope as that of any one of the antibodies described herein (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). The production of chimeric antibodies is described, for example, in international application WO89/09622. Methods for the production of humanized antibodies are described in, *e.g.*, European application EP-A1 0 239 400 and international application WO90/07861. A further source of antibodies to be utilized in accordance with the present invention are so-called xenogeneic antibodies. The general principle for the production of xenogeneic antibodies such as human antibodies in mice is described in, *e.g.*, international applications WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 and WO 96/33735. As discussed above, the antibody of the invention may exist in a variety of forms besides complete antibodies; including, for example, Fv, Fab and $F(ab)_2$, as well as in single chains; see *e.g.* international application WO88/09344.

[0139] The antibodies of the present invention or their corresponding immunoglobulin chain(s) can be further modified using conventional techniques known in the art, for example, by using amino acid deletion(s), insertion(s), substitution(s), addition(s), and/or recombination(s) and/or any other modification(s) known in the art either alone or in combination. Methods for introducing such modifications in the DNA sequence underlying the amino acid sequence of an immunoglobulin chain are well known to the person skilled in the art; see, *e.g.*, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Modifications of the antibody of the invention include chemical and/or enzymatic derivatizations at one or more constituent amino acids, including side chain modifications, backbone modifications, and N- and C-terminal modifications including acetylation, hydroxylation, methylation, amidation, and the attachment of carbohydrate or lipid moieties, cofactors, and the like. Likewise, the present invention encompasses the production of chimeric proteins which comprise the described antibody or some fragment thereof at the amino terminus fused to heterologous molecule such as an immunostimulatory ligand at the carboxyl terminus; see, *e.g.*, international application WO00/30680 for corresponding technical details.

[0140] Additionally, the present invention encompasses small peptides including those containing a binding molecule as described above, for example containing the CDR3 region of the variable region of any one of the mentioned antibodies, in particular CDR3 of the heavy chain since it has frequently been observed that heavy chain CDR3 (HCDR3) is

the region having a greater degree of variability and a predominant participation in antigen-antibody interaction. Such peptides may easily be synthesized or produced by recombinant means to produce a binding agent useful according to the invention. Such methods are well known to those of ordinary skill in the art. Peptides can be synthesized for example, using automated peptide synthesizers which are commercially available. The peptides can be produced by recombinant techniques by incorporating the DNA expressing the peptide into an expression vector and transforming cells with the expression vector to produce the peptide.

[0141] Hence, the present invention relates to any binding molecule, *e.g.*, an antibody or binding fragment which is obtainable in accordance with above described means and display the mentioned properties, *i.e.* which specifically recognize a neoepitope. Such antibodies and binding molecules can be tested for their binding specificity and affinity by for example by using the method of isolating neoepitope specific binding molecules described hereinbefore.

[0142] As an alternative to obtaining immunoglobulins directly from the culture of immortalized B cells or B memory cells, the immortalized cells can be used as a source of rearranged heavy chain and light chain loci for subsequent expression and/or genetic manipulation. Rearranged antibody genes can be reverse transcribed from appropriate mRNAs to produce cDNA. If desired, the heavy chain constant region can be exchanged for that of a different isotype or eliminated altogether. The variable regions can be linked to encode single chain Fv regions. Multiple Fv regions can be linked to confer binding ability to more than one target or chimeric heavy and light chain combinations can be employed. Once the genetic material is available, design of analogs as described above which retain both their ability to bind the de-sired target is straightforward. Methods for the cloning of antibody variable regions and generation of recombinant antibodies are known to the person skilled in the art and are described, for example, Gilliland *et al.*, Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke *et al.*, Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

[0143] Once the appropriate genetic material is obtained and, if desired, modified to encode an analog, the coding sequences, including those that encode, at a minimum, the variable regions of the heavy and light chain, can be inserted into expression systems contained on vectors which can be transfected into standard recombinant host cells. A variety of such host cells may be used; for efficient processing, however, mammalian cells

are preferred. Typical mammalian cell lines useful for this purpose include, but are not limited to, CHO cells, HEK 293 cells, or NSO cells.

[0144] The production of the antibody or analog is then undertaken by culturing the modified recombinant host under culture conditions appropriate for the growth of the host cells and the expression of the coding sequences. The antibodies are then recovered by isolating them from the culture. The expression systems are preferably designed to include signal peptides so that the resulting antibodies are secreted into the medium; however, intracellular production is also possible.

[0145] Once the target structure, *e.g.* the disease-associated protein has been tagged by the sample and respective binding molecule therein it may be identified by means and methods well known in the art, for example using mass spectrometric (MS) techniques such as those described in international application WO00/11208 and specifically those described in Hock *et al.*, Nat Med 8 (2002), 1270-1275; Hock *et al.*, Neuron 38 (2003), 547-554. Thus, in case the antibody identified in accordance with present invention produced *in vitro* binds to pathological structures, for example to beta-amyloid plaques in pathological brain area sections, but not significantly to healthy tissues, a promising antibody candidate has been identified whose molecular target structure can subsequently be enriched and purified via its binding properties to the antibody from pathological tissues and, as a result, can be identified and characterized by means of protein analytical and mass spectrometric methods, like for example MALDI/TOF (Williams, Methods Cell. Biol. 62 (2000), 449-453; Yates, J. Mass. Spectrom. 33 (1998), 1-19).

[0146] Accordingly, in another embodiment the present invention relates to an antigen which is recognized by the binding molecule, especially antibody of the present invention described hereinbefore, and which preferably is at least part of a disorder-associated protein.

[0147] In accordance with the above, the present invention also relates to a polynucleotide encoding the antigen or binding molecule of the present invention, in case of the antibody preferably at least a variable region of an immunoglobulin chain of the antibody described above. Typically, said variable region encoded by the polynucleotide comprises at least one complementarity determining region (CDR) of the V_H and/or V_L of the variable region of the said antibody. The person skilled in the art knows that each variable domain (the heavy chain V_H and light chain V_L) of an antibody comprises three hypervariable regions, sometimes called complementarity determining regions or "CDRs" flanked by four

relatively conserved framework regions or "FRs" and refer to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable regions or CDRs of the human IgG subtype of antibody comprise amino acid residues from residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain as described by Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) and/or those residues from a hypervariable loop, *e.g.* residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain as described by Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Framework or FR residues are those variable domain residues other than and bracketing the hypervaribale regions. The term "specific binding" refers to antibody binding to a predetermined antigen. Typically, the antibody binds with a dissociation constant (K_D) of 10^{-7} M or less, and binds to the predetermined antigen with a K_D that is at least twofold less than its K_D for binding to a nonspecific antigen (*e.g.*, BSA, casein, or any other specified polypeptide) other than the predetermined antigen. The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen". As used herein "highly specific" binding means that the relative K_D of the antibody for the specific target epitope, *e.g.* neoepitope is at least 10-fold less than the K_D for binding that antibody to other ligands or to the native counterpart of the disease-associated protein.

[0148] The affinity or avidity of an antibody for an antigen can be determined experimentally using any suitable method; see, for example, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), and methods described herein. General techniques for measuring the affinity of an antibody for an antigen include ELISA, RIA, and surface plasmon resonance. The measured affinity of a particular antibody-antigen interaction can vary if measured under different conditions, *e.g.*, salt concentration, pH. Thus, measurements of affinity and other antigen-binding parameters, *e.g.*, K_D, IC_{50}, are preferably made with standardized solutions of antibody and antigen, and a standardized buffer.

[0149] The person skilled in the art will readily appreciate that the variable domain of the antibody having the above-described variable domain can be used for the construction of other polypeptides or antibodies of desired specificity and biological function. Thus, the present invention also encompasses polypeptides and antibodies comprising at least one CDR of the above-described variable domain and which advantageously have substantially the same or similar binding properties as the antibody described in the appended examples. The person skilled in the art will readily appreciate that using the variable domains or CDRs described herein antibodies can be constructed according to methods known in the art, *e.g.*, as described in European patent applications EP 0 451 216 A1 and EP 0 549 581 A1. Furthermore, the person skilled in the art knows that binding affinity may be enhanced by making amino acid substitutions within the CDRs or within the hypervariable loops (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) which partially overlap with the CDRs as defined by Kabat. Thus, the present invention also relates to antibodies wherein one or more of the mentioned CDRs comprise one or more, preferably not more than two amino acid substitutions. Preferably, the antibody of the invention comprises in one or both of its immunoglobulin chains two or all three CDRs of the variable regions as set forth in Table 4.

[0150] Binding molecules, *e.g.*, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention, as known by those of ordinary skill in the art, can comprise a constant region which mediates one or more effector functions. For example, binding of the C1 component of complement to an antibody constant region may activate the complement system. Activation of complement is important in the opsonisation and lysis of cell pathogens. The activation of complement also stimulates the inflammatory response and may also be involved in autoimmune hypersensitivity. Further, antibodies bind to receptors on various cells via the Fc region, with a Fc receptor binding site on the antibody Fc region binding to a Fc receptor (FcR) on a cell. There are a number of Fc receptors which are specific for different classes of antibody, including IgG (gamma receptors), IgE (epsilon receptors), IgA (alpha receptors) and IgM (mu receptors). Binding of antibody to Fc receptors on cell surfaces triggers a number of important and diverse biological responses including engulfment and destruction of antibody-coated particles, clearance of immune complexes, lysis of antibody-coated target cells by killer cells (called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, or ADCC), release of inflammatory mediators, placental transfer and control of immunoglobulin production.

[0151] Accordingly, certain embodiments of the invention include an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof, in which at least a fraction of one or more of the constant region domains has been deleted or otherwise altered so as to provide desired biochemical characteristics such as reduced effector functions, the ability to non-covalently dimerize, increased ability to localize at the site of a tumor, reduced serum half-life, or increased serum half-life when compared with a whole, unaltered antibody of approximately the same immunogenicity. For example, certain antibodies for use in the diagnostic and treatment methods described herein are domain deleted antibodies which comprise a polypeptide chain similar to an immunoglobulin heavy chain, but which lack at least a portion of one or more heavy chain domains. For instance, in certain antibodies, one entire domain of the constant region of the modified antibody will be deleted, for example, all or part of the CH2 domain will be deleted. In other embodiments, certain antibodies for use in the diagnostic and treatment methods described herein have a constant region, *e.g.*, an IgG heavy chain constant region, which is altered to eliminate glycosylation, referred to elsewhere herein as aglycosylated or "agly" antibodies. Such "agly" antibodies may be prepared enzymatically as well as by engineering the consensus glycosylation site(s) in the constant region. While not being bound by theory, it is believed that "agly" antibodies may have an improved safety and stability profile *in vivo*. Methods of producing aglycosylated antibodies, having desired effector function are found for example in WO 2005/018572, which is incorporated by reference in its entirety.

[0152] In certain antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof described herein, the Fc portion may be mutated to decrease effector function using techniques known in the art. For example, the deletion or inactivation (through point mutations or other means) of a constant region domain may reduce Fc receptor binding of the circulating modified antibody thereby increasing tumor localization. In other cases it may be that constant region modifications consistent with the instant invention moderate complement binding and thus reduce the serum half life and nonspecific association of a conjugated cytotoxin. Yet other modifications of the constant region may be used to modify disulfide linkages or oligosaccharide moieties that allow for enhanced localization due to increased antigen specificity or antibody flexibility. The resulting physiological profile, bioavailability and other biochemical effects of the modifications, such as tumor localization, biodistribution and serum half-life, may easily be measured and quantified using well know immunological techniques without undue experimentation.

[0153] Modified forms of antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can be made from whole precursor or parent antibodies using techniques known in the art. Exemplary techniques are discussed in more detail herein.

[0154] In certain embodiments both the variable and constant regions of the antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention are fully human. Fully human antibodies can be made using techniques that are known in the art and as described herein. For example, fully human antibodies against a specific antigen can be prepared by administering the antigen to a transgenic animal which has been modified to produce such antibodies in response to antigenic challenge, but whose endogenous loci have been disabled. Exemplary techniques that can be used to make such antibodies are described in US patents: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140. Other techniques are known in the art. Fully human antibodies can likewise be produced by various display technologies, *e.g.*, phage display or other viral display systems, as described in more detail elsewhere herein.

[0155] Antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can be made or manufactured using techniques that are known in the art. In certain embodiments, antibody molecules or fragments thereof are "recombinantly produced," *i.e.*, are produced using recombinant DNA technology. Exemplary techniques for making antibody molecules or fragments thereof are discussed in more detail elsewhere herein.

[0156] Antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention also include derivatives that are modified, *e.g.*, by the covalent attachment of any type of molecule to the antibody such that covalent attachment does not prevent the antibody from specifically binding to its cognate epitope. For example, but not by way of limitation, the antibody derivatives include antibodies that have been modified, *e.g.*, by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, metabolic synthesis of tunicamycin, etc. Additionally, the derivative may contain one or more non-classical amino acids.

[0157] In certain embodiments, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention will not elicit a deleterious immune response in the

animal to be treated, *e.g.*, in a human. In certain embodiments, binding molecules, *e.g.*, antibodies, or antigen-binding fragments thereof of the invention are derived from a patient, *e.g.*, a human patient, and are subsequently used in the same species from which they are derived, *e.g.*, human, alleviating or minimizing the occurrence of deleterious immune responses.

[0158] De-immunization can also be used to decrease the immunogenicity of an antibody. As used herein, the term "de-immunization" includes alteration of an antibody to modify T cell epitopes (*see, e.g.*, WO9852976A1, WO0034317A2). For example, VH and VL sequences from the starting antibody are analyzed and a human T cell epitope "map" from each V region showing the location of epitopes in relation to complementarity-determining regions (CDRs) and other key residues within the sequence. Individual T cell epitopes from the T cell epitope map are analyzed in order to identify alternative amino acid substitutions with a low risk of altering activity of the final antibody. A range of alternative VH and VL sequences are designed comprising combinations of amino acid substitutions and these sequences are subsequently incorporated into a range of binding polypeptides, *e.g.*, neo-epitope-specific antibodies or immunospecific fragments thereof for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein, which are then tested for function. Typically, between 12 and 24 variant antibodies are generated and tested. Complete heavy and light chain genes comprising modified V and human C regions are then cloned into expression vectors and the subsequent plasmids introduced into cell lines for the production of whole antibody. The antibodies are then compared in appropriate biochemical and biological assays, and the optimal variant is identified.

[0159] Monoclonal antibodies can be prepared using a wide variety of techniques known in the art including the use of hybridoma, recombinant, and phage display technologies, or a combination thereof. For example, monoclonal antibodies can be produced using hybridoma techniques including those known in the art and taught, for example, in Harlow *et al., Antibodies: A Laboratory* Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981) (said references incorporated by reference in their entireties). The term "monoclonal antibody" as used herein is not limited to antibodies produced through hybridoma technology. The term "monoclonal antibody" refers to an antibody that is derived from a single clone, including any eukaryotic, prokaryotic, or phage clone, and not the method by which it is produced. Thus, the term "monoclonal antibody" is not limited to

antibodies produced through hybridoma technology. Monoclonal antibodies can be prepared using a wide variety of techniques known in the art. In certain embodiments, antibodies of the present invention are derived from human B cells which have been immortalized via transformation with Epstein-Barr virus, as described herein. .

[0160] In the well known hybridoma process (Kohler *et al., Nature 256*:495 (1975)) the relatively short-lived, or mortal, lymphocytes from a mammal, *e.g.*, B cells derived from a human subject as described herein, are fused with an immortal tumor cell line (*e.g.*,. a myeloma cell line), thus, producing hybrid cells or "hybridomas" which are both immortal and capable of producing the genetically coded antibody of the B cell. The resulting hybrids are segregated into single genetic strains by selection, dilution, and regrowth with each individual strain comprising specific genes for the formation of a single antibody. They produce antibodies, which are homogeneous against a desired antigen and, in reference to their pure genetic parentage, are termed "monoclonal."

[0161] Hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. Those skilled in the art will appreciate that reagents, cell lines and media for the formation, selection and growth of hybridomas are commercially available from a number of sources and standardized protocols are well established. Generally, culture medium in which the hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies against the desired antigen. The binding specificity of the monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by *in vitro* assays such as immunoprecipitation, radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), or neoepitope binding assays as described herein. After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986)). It will further be appreciated that the monoclonal antibodies secreted by the subclones may be separated from culture medium, ascites fluid or serum by conventional purification procedures such as, for example, protein-A, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis or affinity chromatography.

[0162] Antibody fragments that recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, Fab and $F(ab')_2$ fragments may be produced recombinantly or by proteolytic cleavage of immunoglobulin molecules, using enzymes such as papain (to

produce Fab fragments) or pepsin (to produce $F(ab')_2$ fragments). $F(ab')_2$ fragments contain the variable region, the light chain constant region and the CH1 domain of the heavy chain.

[0163] Completely human antibodies, such as described herein, are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Human antibodies can be made by a variety of methods known in the art including phage display methods described above using antibody libraries derived from human immunoglobulin sequences. *See also*, U.S. Pat. Nos. 4,444,887 and 4,716,111; and PCT publications WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, and WO 91/10741; each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Human antibodies of the present invention are isolated, *e.g.*, from patients who are symptom free but affected with the risk of developing a disorder, *e.g.*, Alzheimer's disease, or a patient with the disorder but with an unusually stable disease course.

[0164] In another embodiment, DNA encoding desired monoclonal antibodies may be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The isolated and subcloned hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into prokaryotic or eukaryotic host cells such as, but not limited to, *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulins. More particularly, the isolated DNA (which may be synthetic as described herein) may be used to clone constant and variable region sequences for the manufacture antibodies as described in Newman *et al.*, U.S. Pat. No. 5,658,570, filed January 25, 1995, which is incorporated by reference herein. Essentially, this entails extraction of RNA from the selected cells, conversion to cDNA, and amplification by PCR using Ig specific primers. Suitable primers for this purpose are also described in U.S. Pat. No. 5,658,570. As will be discussed in more detail below, transformed cells expressing the desired antibody may be grown up in relatively large quantities to provide clinical and commercial supplies of the immunoglobulin.

[0165] In one embodiment, an antibody of the invention comprises at least one heavy or light chain CDR of an antibody molecule. In another embodiment, an antibody of the invention comprises at least two CDRs from one or more antibody molecules. In another embodiment, an antibody of the invention comprises at least three CDRs from one or more antibody molecules. In another embodiment, an antibody of the invention comprises at

least four CDRs from one or more antibody molecules. In another embodiment, an antibody of the invention comprises at least five CDRs from one or more antibody molecules. In another embodiment, an antibody of the invention comprises at least six CDRs from one or more antibody molecules. Exemplary antibody molecules comprising at least one CDR that can be included in the subject antibodies are described herein.

[0166] In a specific embodiment, the amino acid sequence of the heavy and/or light chain variable domains may be inspected to identify the sequences of the complementarity determining regions (CDRs) by methods that are well know in the art, *e.g.*, by comparison to known amino acid sequences of other heavy and light chain variable regions to determine the regions of sequence hypervariability. Using routine recombinant DNA techniques, one or more of the CDRs may be inserted within framework regions, *e.g.*, into human framework regions. The framework regions may be naturally occurring or consensus framework regions, and preferably human framework regions (*see, e.g.*, Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol. 278*:457-479 (1998) for a listing of human framework regions). In certain embodiments, the polynucleotide generated by the combination of the framework regions and CDRs encodes an antibody that specifically binds to at least one epitope of a desired polypeptide. In certain embodiments, one or more amino acid substitutions may be made within the framework regions, to, *e.g.*, improve binding of the antibody to its antigen. Additionally, such methods may be used to make amino acid substitutions or deletions of one or more variable region cysteine residues participating in an intrachain disulfide bond to generate antibody molecules lacking one or more intrachain disulfide bonds. Other alterations to the polynucleotide are encompassed by the present invention and within the skill of the art.

[0167] Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,694,778; Bird, *Science 242*:423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*:5879-5883 (1988); and Ward *et al.*, *Nature 334*:544-554 (1989)) can be adapted to produce single chain antibodies. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain antibody. Techniques for the assembly of functional Fv fragments in *E coli* may also be used (Skerra *et al.*, *Science 242*:1038-1041 (1988)).

[0168] In another embodiment, lymphocytes can be selected by micromanipulation and the variable genes isolated. For example, peripheral blood mononuclear cells can be isolated from an immunized or naturally immune mammal, *e.g.*, a human, and cultured for about 7

days *in vitro*. The cultures can be screened for specific IgGs that meet the screening criteria. Cells from positive wells can be isolated. Individual Ig-producing B cells can be isolated by FACS or by identifying them in a complement-mediated hemolytic plaque assay. Ig-producing B cells can be micromanipulated into a tube and the VH and VL genes can be amplified using, *e.g.*, RT-PCR. The VH and VL genes can be cloned into an antibody expression vector and transfected into cells (*e.g.*, eukaryotic or prokaryotic cells) for expression.

[0169] Alternatively, antibody-producing cell lines may be selected and cultured using techniques well known to the skilled artisan. Such techniques are described in a variety of laboratory manuals and primary publications. In this respect, techniques suitable for use in the invention as described below are described in *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) which is herein incorporated by reference in its entirety, including supplements.

[0170] Antibodies of the present invention can be produced by any method known in the art for the synthesis of antibodies, in particular, by chemical synthesis or preferably, by recombinant expression techniques as described herein.

[0171] In one embodiment, an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof of the invention comprises a synthetic constant region wherein one or more domains are partially or entirely deleted ("domain-deleted antibodies"). In certain embodiments compatible modified antibodies will comprise domain deleted constructs or variants wherein the entire CH2 domain has been removed (ΔCH2 constructs). For other embodiments a short connecting peptide may be substituted for the deleted domain to provide flexibility and freedom of movement for the variable region. Those skilled in the art will appreciate that such constructs are particularly preferred due to the regulatory properties of the CH2 domain on the catabolic rate of the antibody. Domain deleted constructs can be derived using a vector encoding an IgG_1 human constant domain (*see, e.g.*, WO 02/060955A2 and WO02/096948A2). This vector is engineered to delete the CH2 domain and provide a synthetic vector expressing a domain deleted IgG_1 constant region.

[0172] In certain embodiments, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the present invention are minibodies. Minibodies can be made using methods described in the art (*see, e.g.*, US patent 5,837,821 or WO 94/09817A1).

[0173] In one embodiment, an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof of the invention comprises an immunoglobulin heavy chain having deletion or substitution of a few or even a single amino acid as long as it permits association between the monomeric subunits. For example, the mutation of a single amino acid in selected areas of the CH2 domain may be enough to substantially reduce Fc binding and thereby increase tumor localization. Similarly, it may be desirable to simply delete that part of one or more constant region domains that control the effector function (*e.g.* complement binding) to be modulated. Such partial deletions of the constant regions may improve selected characteristics of the antibody (serum half-life) while leaving other desirable functions associated with the subject constant region domain intact. Moreover, as alluded to above, the constant regions of the disclosed antibodies may be synthetic through the mutation or substitution of one or more amino acids that enhances the profile of the resulting construct. In this respect it may be possible to disrupt the activity provided by a conserved binding site (*e.g.* Fc binding) while substantially maintaining the configuration and immunogenic profile of the modified antibody. Yet other embodiments comprise the addition of one or more amino acids to the constant region to enhance desirable characteristics such as effector function or provide for more cytotoxin or carbohydrate attachment. In such embodiments it may be desirable to insert or replicate specific sequences derived from selected constant region domains.

[0174] The present invention also provides antibodies that comprise, consist essentially of, or consist of, variants (including derivatives) of antibody molecules (*e.g.*, the VH regions and/or VL regions) described herein, which antibodies or fragments thereof immunospecifically bind to a disorder-associated polypeptide or fragment or variant thereof. Standard techniques known to those of skill in the art can be used to introduce mutations in the nucleotide sequence encoding an antibody, including, but not limited to, site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis which result in amino acid substitutions. Preferably, the variants (including derivatives) encode less than 50 amino acid substitutions, less than 40 amino acid substitutions, less than 30 amino acid substitutions, less than 25 amino acid substitutions, less than 20 amino acid substitutions, less than 15 amino acid substitutions, less than 10 amino acid substitutions, less than 5

amino acid substitutions, less than 4 amino acid substitutions, less than 3 amino acid substitutions, or less than 2 amino acid substitutions relative to the reference VH region, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL region, VL-CDR1, VL-CDR2, or VL-CDR3. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a side chain with a similar charge. Families of amino acid residues having side chains with similar charges have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity (*e.g.*, the ability to bind an disorder-associated polypeptide).

[0175] For example, it is possible to introduce mutations only in framework regions or only in CDR regions of an antibody molecule. Introduced mutations may be silent or neutral missense mutations, *e.g.*, have no, or little, effect on an antibody's ability to bind antigen, indeed some such mutations do not alter the amino acid sequence whatsoever. These types of mutations may be useful to optimize codon usage, or improve a hybridoma's antibody production. Codon-optimized coding regions encoding antibodies of the present invention are disclosed elsewhere herein. Alternatively, non-neutral missense mutations may alter an antibody's ability to bind antigen. The location of most silent and neutral missense mutations is likely to be in the framework regions, while the location of most non-neutral missense mutations is likely to be in CDR, though this is not an absolute requirement. One of skill in the art would be able to design and test mutant molecules with desired properties such as no alteration in antigen binding activity or alteration in binding activity (*e.g.*, improvements in antigen binding activity or change in antibody specificity). Following mutagenesis, the encoded protein may routinely be expressed and the functional and/or biological activity of the encoded protein, (*e.g.*, ability to immunospecifically bind at least one epitope of a disorder-associated polypeptide) can be determined using techniques described herein or by routinely modifying techniques known in the art.

IV. Polynucleotides Encoding Antibodies

[0176] In accordance with the above, the present invention also relates to a polynucleotide encoding a binding molecule of the present invention,, *e.g.*, an antibody. In case of the antibodythe polynucleotide may encode at least a variable region of an immunoglobulin chain of the antibody described above. The polynucleotide of the invention encoding the above described antibody may be, *e.g.*, DNA, cDNA, RNA or synthetically produced DNA or RNA or a recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of those polynucleotides either alone or in combination. Preferably said polynucleotide is part of a vector. Such vectors may comprise further genes such as marker genes which allow for the selection of said vector in a suitable host cell and under suitable conditions. Preferably, the polynucleotide of the invention is operatively linked to expression control sequences allowing expression in prokaryotic or eukaryotic cells. Expression of said polynucleotide comprises transcription of the polynucleotide into a translatable mRNA. Regulatory elements ensuring expression in eukaryotic cells, preferably mammalian cells, are well known to those skilled in the art. They usually comprise regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and stabilization of the transcript. Additional regulatory elements may include transcriptional as well as translational enhancers, and/or naturally associated or heterologous promoter regions.

[0177] A polynucleotide encoding an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof can be composed of any polyribonucleotide or polydeoxribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. For example, a polynucleotide encoding an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof can be composed of single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, a polynucleotide encoding an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof can be composed of triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. A polynucleotide encoding an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof may also contain one or more modified bases or DNA or RNA backbones modified

for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications can be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically, or metabolically modified forms.

[0178] An isolated polynucleotide encoding a non-natural variant of a polypeptide derived from an immunoglobulin (*e.g.*, an immunoglobulin heavy chain portion or light chain portion) can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of the immunoglobulin such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Mutations may be introduced by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more non-essential amino acid residues.

[0179] As is well known, RNA may be isolated from the original hybridoma cells or from other transformed cells by standard techniques, such as guanidinium isothiocyanate extraction and precipitation followed by centrifugation or chromatography. Where desirable, mRNA may be isolated from total RNA by standard techniques such as chromatography on oligo dT cellulose. Suitable techniques are familiar in the art.

[0180] In one embodiment, cDNAs that encode the light and the heavy chains of the antibody may be made, either simultaneously or separately, using reverse transcriptase and DNA polymerase in accordance with well known methods. PCR may be initiated by consensus constant region primers or by more specific primers based on the published heavy and light chain DNA and amino acid sequences. As discussed above, PCR also may be used to isolate DNA clones encoding the antibody light and heavy chains. In this case the libraries may be screened by consensus primers or larger homologous probes, such as mouse constant region probes.

[0181] DNA, typically plasmid DNA, may be isolated from the cells using techniques known in the art, restriction mapped and sequenced in accordance with standard, well known techniques set forth in detail, *e.g.*, in the foregoing references relating to recombinant DNA techniques. Of course, the DNA may be synthetic according to the present invention at any point during the isolation process or subsequent analysis.

[0182] In one embodiment, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising, consisting essentially of, or consisting of a nucleic acid encoding an immunoglobulin heavy chain variable region (VH), where at least one of the CDRs of the

heavy chain variable region or at least two of the VH-CDRs of the heavy chain variable region are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference heavy chain VH-CDR1, VH-CDR2, or VH-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Alternatively, the VH-CDR1, VH-CDR2, and VH-CDR3 regions of the VH are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference heavy chain VH-CDR1, VH-CDR2, and VH-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Thus, according to this embodiment a heavy chain variable region of the invention has VH-CDR1, VH-CDR2, or VH-CDR3 polypeptide sequences related to the polypeptide sequences shown in Table 4.

[0183] In another embodiment, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising, consisting essentially of, or consisting of a nucleic acid encoding an immunoglobulin light chain variable region (VL), where at least one of the VL-CDRs of the light chain variable region or at least two of the VL-CDRs of the light chain variable region are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference light chain VL-CDR1, VL-CDR2, or VL-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Alternatively, the VL-CDR1, VL-CDR2, and VL-CDR3 regions of the VL are at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to reference light chain VL-CDR1, VL-CDR2, and VL-CDR3 amino acid sequences from the antibodies disclosed herein. Thus, according to this embodiment a light chain variable region of the invention has VL-CDR1, VL-CDR2, or VL-CDR3 polypeptide sequences related to the polypeptide sequences shown in Table 4.

[0184] In another embodiment, the present invention provides an isolated polynucleotide comprising, consisting essentially of, or consisting of a nucleic acid encoding an immunoglobulin heavy chain variable region (VH) in which the VH-CDR1, VH-CDR2, and VH-CDR3 regions have polypeptide sequences which are identical to the VH-CDR1, VH-CDR2, and VH-CDR3 groups shown in Table 4.

[0185] As known in the art, "sequence identity" between two polypeptides or two polynucleotides is determined by comparing the amino acid or nucleic acid sequence of one polypeptide or polynucleotide to the sequence of a second polypeptide or polynucleotide. When discussed herein, whether any particular polypeptide is at least about 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% or 95% identical to another polypeptide can be determined using methods and computer programs/software known in the art such as, but not limited to, the BESTFIT program (Wisconsin Sequence Analysis Package,

Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT uses the local homology algorithm of Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), to find the best segment of homology between two sequences. When using BESTFIT or any other sequence alignment program to determine whether a particular sequence is, for example, 95% identical to a reference sequence according to the present invention, the parameters are set, of course, such that the percentage of identity is calculated over the full length of the reference polypeptide sequence and that gaps in homology of up to 5% of the total number of amino acids in the reference sequence are allowed.

Table 5: Polynucleotide sequences of the V_H region of neoepitope specific antibodies.

Antibody	Variable heavy chain sequence
NI-101.10 (SEQ ID NO:3)	GAGGTGCAGCTAGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:5) (codon-optimized)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGGCCGGAGCCTGCGGCTGAG CTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGG CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCGG CGGGGCCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
NI-101.12 (SEQ ID NO:9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCGCCGAGACCCTGAGCCTGACC TGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCCGGAGCGGCAGCATCTGCTGGTACTGGATCCGGCAGCCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACTTCTGCTACAGCGGCGCCACCTTCTACACCCCCA GCCTGCGGGGCCGGCTGACCATCAGCGTGGACGCCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGAGCCTGA GCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGCGGGCCGGCGAGAACAGC GGCGGCATCGAGCCCTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGC AGC

NI-101.13 (SEQ ID NO:13)	CAGGTACAGCTGCAGGAGTCAGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTCTCTTCG
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:38)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.13A (SEQ ID NO:52)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
NI-101.13B (SEQ ID NO:53)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG

Table 6: Polynucleotide sequences of the V_L region of neoepitope specific antibodies.

Antibody	Variable light chain sequence (kappa or lambda)
NI-101.10 and NI-101.11 (SEQ ID NO:7)	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACT GTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G
NI-101.12 (SEQ ID NO:11)	GACGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCATCGGCGACCGGGTGACC ATCACCTGCCGGGCCAGCGAGAGCATCAACAAGTACGTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCA AGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGCCCCCAGCCGGGTGA GCGGCAGCGGCTTCGGCCGGGACTTCAGCCTGACCATCAGCGGCCTGCAGGCCGAGGACTTCG GCGCCTACTTCTGCCAGCAGAGCTACAGCGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA GATCAAGCGGACC
NI-101.13 (SEQ ID	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGCGAGCGGCACCCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGC TGCAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGCAGCAACTATGTGTATTGGTATCAGCAGCCGCCGGGCA

NO:15)	CCGCGCCGAAACTGCTGATTTATCGCAACAACCAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAG CGGCAGCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTGGCGATTAGCGGCCTGCGCAGCGAAGATGAAGC GGATTATTATTGCGCGGCGTGGGATGATAGCCTGAGCGGCTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAA GTGACCGTGCTG
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:40)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT
NI-101.13A (SEQ ID NO:54)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTAC TGTCAACAGAGTTACAGTACCAGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
NI-101.13B (SEQ ID NO:55)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGATTCCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTA CG

[0186] In this respect, the person skilled in the art will readily appreciate that the polynucleotides encoding at least the variable domain of the light and/or heavy chain may encode the variable domains of both immunoglobulin chains or only one. Likewise, said polynucleotides may be under the control of the same promoter or may be separately controlled for expression. Possible regulatory elements permitting expression in prokaryotic host cells comprise, *e.g.*, the P_L, lac, trp or tac promoter in E. coli, and examples for regulatory elements permitting expression in eukaryotic host cells are the AOX1 or GAL1 promoter in yeast or the CMV-, SV40- , RSV-promoter, CMV-enhancer, SV40-enhancer or a globin intron in mammalian and other animal cells. Beside elements which are responsible for the initiation of transcription such regulatory elements may also comprise transcription termination signals, such as the SV40-poly-A site or the tk-poly-A site, downstream of the polynucleotide. Furthermore, depending on the expression system used leader sequences capable of directing the polypeptide to a cellular compartment or secreting it into the medium may be added to the coding sequence of the polynucleotide of the invention and are well known in the art. The leader sequence(s) is (are) assembled in appropriate phase with translation, initiation and termination sequences, and preferably, a

leader sequence capable of directing secretion of translated protein, or a portion thereof, into the periplasmic space or extracellular medium. Optionally, the heterologous sequence can encode a fusion protein including a C- or N-terminal identification peptide imparting desired characteristics, *e.g.*, stabilization or simplified purification of expressed recombinant product. In this context, suitable expression vectors are known in the art such as Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), or pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the immunoglobulin light chains, heavy chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms may follow; see, Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979).

[0187] The present invention also includes fragments of the polynucleotides of the invention, as described elsewhere. Additionally polynucleotides which encode fusion polynucleotides, Fab fragments, and other derivatives, as described herein, are also contemplated by the invention.

[0188] The polynucleotides may be produced or manufactured by any method known in the art. For example, if the nucleotide sequence of the antibody is known, a polynucleotide encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (*e.g.*, as described in Kutmeier *et al.*, *BioTechniques 17*:242 (1994)), which, briefly, involves the synthesis of overlapping oligonucleotides containing portions of the sequence encoding the antibody, annealing and ligating of those oligonucleotides, and then amplification of the ligated oligonucleotides by PCR.

[0189] Alternatively, a polynucleotide encoding an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof may be generated from nucleic acid from a suitable source. If a clone containing a nucleic acid encoding a particular antibody is not available, but the sequence of the antibody molecule is known, a nucleic acid encoding the antibody may be chemically synthesized or obtained from a suitable source (*e.g.*, an antibody cDNA library, or a cDNA library generated from, or nucleic acid, preferably poly A+RNA, isolated from, any tissue or cells expressing the neoantigen-specific antibody, such as hybridoma cells

selected to express an antibody) by PCR amplification using synthetic primers hybridizable to the 3' and 5' ends of the sequence or by cloning using an oligonucleotide probe specific for the particular gene sequence to identify, *e.g.*, a cDNA clone from a cDNA library that encodes the antibody. Amplified nucleic acids generated by PCR may then be cloned into replicable cloning vectors using any method well known in the art.

[0190] Once the nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof is determined, its nucleotide sequence may be manipulated using methods well known in the art for the manipulation of nucleotide sequences, *e.g.*, recombinant DNA techniques, site directed mutagenesis, PCR, etc. (see, for example, the techniques described in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) and Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), which are both incorporated by reference herein in their entireties), to generate antibodies having a different amino acid sequence, for example to create amino acid substitutions, deletions, and/or insertions.

V. Expression of Antibody Polypeptides

[0191] The present invention also involves a method for producing cells capable of expressing an antibody of the invention or its corresponding immunoglobulin chain(s) comprising genetically engineering cells with the polynucleotide or with the vector of the invention. The cells obtainable by the method of the invention can be used, for example, to test the interaction of the antibody of the invention with its antigen.

[0192] Following manipulation of the isolated genetic material to provide antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention, the polynucleotides encoding the antibodies are typically inserted in an expression vector for introduction into host cells that may be used to produce the desired quantity of antibody.

[0193] Recombinant expression of an antibody, or fragment, derivative or analog thereof, *e.g.*, a heavy or light chain of an antibody which binds to a target molecule described herein. Once a polynucleotide encoding an antibody molecule or a heavy or light chain of an antibody, or portion thereof (preferably containing the heavy or light chain variable domain), of the invention has been obtained, the vector for the production of the antibody molecule may be produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Thus, methods for preparing a protein by expressing a polynucleotide containing

an antibody encoding nucleotide sequence are described herein. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing antibody coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. The invention, thus, provides replicable vectors comprising a nucleotide sequence encoding an antibody molecule of the invention, or a heavy or light chain thereof, or a heavy or light chain variable domain, operably linked to a promoter. Such vectors may include the nucleotide sequence encoding the constant region of the antibody molecule (*see, e.g.*, PCT Publication WO 86/05807; PCT Publication WO 89/01036; and U.S. Pat. No. 5,122,464) and the variable domain of the antibody may be cloned into such a vector for expression of the entire heavy or light chain.

[0194] The present invention relates to vectors, particularly plasmids, cosmids, viruses and bacteriophages used conventionally in genetic engineering that comprise a polynucleotide encoding the antigen or preferably a variable domain of an immunoglobulin chain of an antibody of the invention; optionally in combination with a polynucleotide of the invention that encodes the variable domain of the other immunoglobulin chain of the antibody of the in-vention. Preferably, said vector is an expression vector and/or a gene transfer or targeting vector. Expression vectors derived from viruses such as retroviruses, vaccinia virus, adeno-associated virus, herpes viruses, or bovine papilloma virus, may be used for delivery of the polynucleotides or vector of the invention into targeted cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant viral vectors; see, for example, the techniques described in Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternatively, the polynucleotides and vectors of the invention can be reconstituted into liposomes for delivery to target cells. The vectors containing the polynucleotides of the invention (*e.g.*, the heavy and/or light variable domain(s) of the immunoglobulin chains encoding sequences and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts; see Sambrook, *supra*.

[0195] The term "vector" or "expression vector" is used herein to mean vectors used in accordance with the present invention as a vehicle for introducing into and expressing a desired gene in a host cell. As known to those skilled in the art, such vectors may easily be selected from the group consisting of plasmids, phages, viruses and retroviruses. In general, vectors compatible with the instant invention will comprise a selection marker, appropriate restriction sites to facilitate cloning of the desired gene and the ability to enter and/or replicate in eukaryotic or prokaryotic cells.

[0196] For the purposes of this invention, numerous expression vector systems may be employed. For example, one class of vector utilizes DNA elements which are derived from animal viruses such as bovine papilloma virus, polyoma virus, adenovirus, vaccinia virus, baculovirus, retroviruses (RSV, MMTV or MOMLV) or SV40 virus. Others involve the use of polycistronic systems with internal ribosome binding sites. Additionally, cells which have integrated the DNA into their chromosomes may be selected by introducing one or more markers which allow selection of transfected host cells. The marker may provide for prototrophy to an auxotrophic host, biocide resistance (*e.g.*, antibiotics) or resistance to heavy metals such as copper. The selectable marker gene can either be directly linked to the DNA sequences to be expressed, or introduced into the same cell by cotransformation. Additional elements may also be needed for optimal synthesis of mRNA. These elements may include signal sequences, splice signals, as well as transcriptional promoters, enhancers, and termination signals.

[0197] In particularly preferred embodiments the cloned variable region genes are inserted into an expression vector along with the heavy and light chain constant region genes (preferably human) synthetic as discussed above. In one embodiment, this is effected using a proprietary expression vector of Biogen IDEC, Inc., referred to as NEOSPLA (disclosed in U.S. patent 6,159,730). This vector contains the cytomegalovirus promoter/enhancer, the mouse beta globin major promoter, the SV40 origin of replication, the bovine growth hormone polyadenylation sequence, neomycin phosphotransferase exon 1 and exon 2, the dihydrofolate reductase gene and leader sequence. This vector has been found to result in very high level expression of antibodies upon incorporation of variable and constant region genes, transfection in CHO cells, followed by selection in G418 containing medium and methotrexate amplification. Of course, any expression vector which is capable of eliciting expression in eukaryotic cells may be used in the present invention. Examples of suitable vectors include, but are not limited to plasmids pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His,

pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, and pZeoSV2 (available from Invitrogen, San Diego, CA), and plasmid pCI (available from Promega, Madison, WI). In general, screening large numbers of transformed cells for those which express suitably high levels if immunoglobulin heavy and light chains is routine experimentation which can be carried out, for example, by robotic systems. Vector systems are also taught in U.S. Pat. Nos. 5,736,137 and 5,658,570, each of which is incorporated by reference in its entirety herein. This system provides for high expression levels, *e.g.*, > 30 pg/cell/day. Other exemplary vector systems are disclosed *e.g.*, in U.S. Patent 6,413,777.

[0198] In other preferred embodiments the antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention may be expressed using polycistronic constructs such as those disclosed in United States Patent Application Publication No. 2003-0157641 A1, filed November 18, 2002 and incorporated herein in its entirety. In these novel expression systems, multiple gene products of interest such as heavy and light chains of antibodies may be produced from a single polycistronic construct. These systems advantageously use an internal ribosome entry site (IRES) to provide relatively high levels of antibodies. Compatible IRES sequences are disclosed in U.S. Pat. No. 6,193,980 which is also incorporated herein. Those skilled in the art will appreciate that such expression systems may be used to effectively produce the full range of antibodies disclosed in the instant application.

[0199] More generally, once the vector or DNA sequence encoding a monomeric subunit of the antibody has been prepared, the expression vector may be introduced into an appropriate host cell. Introduction of the plasmid into the host cell can be accomplished by various techniques well known to those of skill in the art. These include, but are not limited to, transfection (including electrophoresis and electroporation), protoplast fusion, calcium phosphate precipitation, cell fusion with enveloped DNA, microinjection, and infection with intact virus. *See*, Ridgway, A. A. G. "*Mammalian Expression Vectors*" Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., Chapter 24.2, pp. 470-472 (1988). Typically, plasmid introduction into the host is via electroporation. The host cells harboring the expression construct are grown under conditions appropriate to the production of the light chains and heavy chains, and assayed for heavy and/or light chain protein synthesis. Exemplary assay techniques include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), or fluorescence-activated cell sorter analysis (FACS), immunohistochemistry and the like.

[0200] The expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques and the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce an antibody for use in the methods described herein. Thus, the invention includes host cells containing a polynucleotide encoding an antibody of the invention, or a heavy or light chain thereof, operably linked to a heterologous promoter. In preferred embodiments for the expression of double-chained antibodies, vectors encoding both the heavy and light chains may be co-expressed in the host cell for expression of the entire immunoglobulin molecule, as detailed below.

[0201] The present invention furthermore relates to host cells transformed with a polynucleotide or vector of the invention. Said host cell may be a prokaryotic or eukaryotic cell. The polynucleotide or vector of the invention which is present in the host cell may either be integrated into the genome of the host cell or it may be maintained extrachromosomally. The host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell, such as a bacterial, insect, fungal, plant, animal or human cell. Preferred fungal cells are, for example, those of the genus *Saccharomyces*, in particular those of the species *S. cerevisiae*. The term "prokaryotic" is meant to include all bacteria which can be transformed or transfected with a DNA or RNA molecules for the expression of an antibody of the invention or the corresponding immu-noglobulin chains. Prokaryotic hosts may include gram negative as well as gram positive bacteria such as, for example, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Bacillus subtilis*. The term "eukaryotic" is meant to include yeast, higher plant, insect and preferably mammalian cells, most preferably HEK 293, NSO and CHO cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the antibodies or immunoglobulin chains encoded by the polynucleotide of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. Antibodies of the invention or the corresponding immunoglobulin chains may also include an initial methionine amino acid residue. A polynucleotide of the invention can be used to transform or transfect the host using any of the techniques commonly known to those of ordinary skill in the art. Furthermore, methods for preparing fused, operably linked genes and expressing them in, *e.g.*, mammalian cells and bacteria are well-known in the art (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). The genetic constructs and methods described therein can be utilized for expression of the antibody of the invention or the corresponding immunoglobulin chains in eukaryotic or prokaryotic hosts. In general, expression vectors containing

promoter sequences which facilitate the efficient transcription of the inserted polynucleotide are used in connection with the host. The expression vector typically contains an origin of replication, a promoter, and a terminator, as well as specific genes which are capable of providing phenotypic selection of the transformed cells. Suitable source cells for the DNA sequences and host cells for immunoglobulin expression and secretion can be obtained from a number of sources, such as the American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, U.S.A., which is incorporated herein by reference). Furthermore, transgenic animals, preferably mammals, comprising cells of the invention may be used for the large scale production of the antibody of the invention.

[0202] Thus, in a further embodiment, the present invention relates to a method for the production of a disorder-associated protein specific binding molecule, *e.g.*, an antibody or a binding fragment or immunoglobulin chain(s) thereof, said method comprising

(a) culturing a cell as described above; and

(b) isolating said antigen, binding molecule, antibody or binding fragment or immunoglobulin chain(s) thereof from the culture.

[0203] The transformed hosts can be grown in fermentors and cultured according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention, can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). The antibody or its corresponding immunoglobulin chain(s) of the invention can then be isolated from the growth medium, cellular lysates, or cellular membrane fractions. The isolation and purification of the, *e.g.*, recombinantly expressed antibodies or immunoglobulin chains of the invention may be by any conventional means such as, for example, preparative chromatographic separations and immunological separations such as those involving the use of monoclonal or polyclonal antibodies directed, *e.g.*, against the constant region of the antibody of the invention. It will be apparent to those skilled in the art that the antibodies of the invention can be further coupled to other moieties for, *e.g.*, drug targeting and imaging applications. Such coupling may be conducted chemically after expression of the antibody or antigen to site of attachment or the coupling product may be engineered into the antibody or antigen of the invention at the DNA level. The DNAs are

then expressed in a suitable host system, and the expressed proteins are collected and renatured, if necessary.

[0204] Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the antibodies may then be used therapeutically (including extracorporally) or in developing and performing assay procedures.

[0205] The host cell may be co-transfected with two expression vectors of the invention, the first vector encoding a heavy chain derived polypeptide and the second vector encoding a light chain derived polypeptide. The two vectors may contain identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain is advantageously placed before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy chain (Proudfoot, *Nature 322*:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77*:2197 (1980)). The coding sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

[0206] As used herein, "host cells" refers to cells which harbor vectors constructed using recombinant DNA techniques and encoding at least one heterologous gene. In descriptions of processes for isolation of antibodies from recombinant hosts, the terms "cell" and "cell culture" are used interchangeably to denote the source of antibody unless it is clearly specified otherwise. In other words, recovery of polypeptide from the "cells" may mean either from spun down whole cells, or from the cell culture containing both the medium and the suspended cells.

[0207] A variety of host-expression vector systems may be utilized to express antibody molecules for use in the methods described herein. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express an antibody molecule of the invention *in situ*. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria (*e.g.*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing antibody coding sequences; yeast (*e.g.*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing antibody coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*,

baculovirus) containing antibody coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (*e.g.*, Ti plasmid) containing antibody coding sequences; or mammalian cell systems (*e.g.*, COS, CHO, BLK, 293, 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (*e.g.*, metallothionein promoter) or from mammalian viruses (*e.g.*, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter). Preferably, bacterial cells such as *Escherichia coli*, and more preferably, eukaryotic cells, especially for the expression of whole recombinant antibody molecule, are used for the expression of a recombinant antibody molecule. For example, mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO), in conjunction with a vector such as the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus is an effective expression system for antibodies (Foecking *et al.*, *Gene 45*:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology 8*:2 (1990)).

[0208] The host cell line used for protein expression is often of mammalian origin; those skilled in the art are credited with ability to preferentially determine particular host cell lines which are best suited for the desired gene product to be expressed therein. Exemplary host cell lines include, but are not limited to, CHO (Chinese Hamster Ovary), DG44 and DUXB11 (Chinese Hamster Ovary lines, DHFR minus), HELA (human cervical carcinoma), CVI (monkey kidney line), COS (a derivative of CVI with SV40 T antigen), VERY, BHK (baby hamster kidney), MDCK, 293, WI38, R1610 (Chinese hamster fibroblast) BALBC/3T3 (mouse fibroblast), HAK (hamster kidney line), SP2/O (mouse myeloma), P3x63-Ag3.653 (mouse myeloma), BFA-1c1BPT (bovine endothelial cells), RAJI (human lymphocyte) and 293 (human kidney). CHO cells are particularly preferred. Host cell lines are typically available from commercial services, the American Tissue Culture Collection or from published literature.

[0209] In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (*e.g.*, glycosylation) and processing (*e.g.*, cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed.

To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used.

[0210] For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the antibody molecule may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (*e.g.*, promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which stably express the antibody molecule.

[0211] A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell 11*:223 (1977)), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48*:202 (1992)), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell 22*:817 1980) genes can be employed in tk-, hgprt- or aprt-cells, respectively. Also, anti-metabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA 77*:357 (1980); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:1527 (1981)); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78*:2072 (1981)); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 *Clinical Pharmacy 12*:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy 3*:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32*:573-596 (1993); Mulligan, *Science 260*:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem. 62*:191-217 (1993); *TIB TECH 11(5)*:155-215 (May, 1993); and hygro, which confers resistance to hygromycin (Santerre *et al.*, *Gene 30*:147 (1984). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human*

Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol. 150*:1 (1981), which are incorporated by reference herein in their entireties.

[0212] The expression levels of an antibody molecule can be increased by vector amplification (for a review, *see* Bebbington and Hentschel, *The use of* vectors *based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)). When a marker in the vector system expressing antibody is amplifiable, increase in the level of inhibitor present in culture of host cell will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the antibody gene, production of the antibody will also increase (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol. 3*:257 (1983)).

[0213] *In vitro* production allows scale-up to give large amounts of the desired polypeptides. Techniques for mammalian cell cultivation under tissue culture conditions are known in the art and include homogeneous suspension culture, *e.g.* in an airlift reactor or in a continuous stirrer reactor, or immobilized or entrapped cell culture, *e.g.* in hollow fibers, microcapsules, on agarose microbeads or ceramic cartridges. If necessary and/or desired, the solutions of polypeptides can be purified by the customary chromatography methods, for example gel filtration, ion-exchange chromatography, chromatography over DEAE-cellulose or (immuno-)affinity chromatography, *e.g.*, after preferential biosynthesis of a synthetic hinge region polypeptide or prior to or subsequent to the HIC chromatography step described herein.

[0214] Genes encoding antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can also be expressed non-mammalian cells such as bacteria or insect or yeast or plant cells. Bacteria which readily take up nucleic acids include members of the enterobacteriaceae, such as strains of *Escherichia coli* or *Salmonella*; Bacillaceae, such as *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, and *Haemophilus influenzae*. It will further be appreciated that, when expressed in bacteria, the heterologous polypeptides typically become part of inclusion bodies. The heterologous polypeptides must be isolated, purified and then assembled into functional molecules. Where tetravalent forms of antibodies are desired, the subunits will then self-assemble into tetravalent antibodies (WO02/096948A2).

[0215] In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the antibody molecule being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of

pharmaceutical compositions of an antibody molecule, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J. 2*:1791 (1983)), in which the antibody coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the lacZ coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res. 13*:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem. 24*:5503-5509 (1989)); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption and binding to a matrix glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

[0216] In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes may also be used. *Saccharomyces cerevisiae*, or common baker's yeast, is the most commonly used among eukaryotic microorganisms although a number of other strains are commonly available, *e.g.*, *Pichia pastoris*.

[0217] For expression in *Saccharomyces*, the plasmid YRp7, for example, (Stinchcomb *et al.*, Nature *282*:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene 7*:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene 10*:157 (1980)) is commonly used. This plasmid already contains the TRP1 gene which provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example ATCC No. 44076 or PEP4-1 (Jones, *Genetics 85*:12 (1977)). The presence of the trpl lesion as a characteristic of the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan.

[0218] In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is typically used as a vector to express foreign genes. The virus grows in Spodoptera *frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter).

[0219] Once an antibody molecule of the invention has been recombinantly expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an immunoglobulin molecule, for example, by chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, particularly by affinity for the specific antigen after Protein A, and sizing column chromatography),

centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins. Alternatively, a preferred method for increasing the affinity of antibodies of the invention is disclosed in US 2002 0123057 A1.

VI. Fusion Proteins and Conjugates

[0220] The antibodies of the present invention can comprise a further domain, said domain being linked by covalent or non-covalent bonds. The linkage can be based on genetic fusion according to the methods known in the art and described above or can be performed by, *e.g.*, chemical cross-linking as described in, *e.g.*, international application WO94/04686. The additional domain present in the fusion protein comprising the antibody of the invention may preferably be linked by a flexible linker, advantageously a polypeptide linker, wherein said polypeptide linker comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of said further domain and the N-terminal end of the antibody of the invention or vice versa. The therapeutically or diagnostically active agent can be coupled to the antibody of the invention or an antigen-binding fragment thereof by various means. This includes, for example, single-chain fusion proteins comprising the variable regions of the antibody of the invention coupled by covalent methods, such as peptide linkages, to the therapeutically or diagnostically active agent. Further examples include molecules which comprise at least an antigen-binding fragment coupled to additional molecules covalently or non-covalently include those in the following non-limiting illustrative list. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, describe the bispecific reagent janusin in which the Fv region directed to CD3 is coupled to soluble CD4 or to other ligands such as OVCA and IL-7. Similarly, the variable regions of the antibody of the invention can be constructed into Fv molecules and coupled to alternative ligands such as those illustrated in the cited article. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, described a hetero-conjugate antibody composed of OKT3 cross-linked to an antibody directed to a specific sequence in the V3 region of GP120. Such hetero-conjugate antibodies can also be constructed using at least the variable regions contained in the antibody of the invention methods. Additional examples of specific antibodies include those described by Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 and by Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124.

[0221] In a further embodiment of the present invention, the binding molecule, antibody, immunoglobulin chain or a binding fragment thereof or the antigen is detectably labeled. Labeling agents can be coupled either directly or indirectly to the antibodies or antigens of the invention. One example of indirect coupling is by use of a spacer moiety.

[0222] Hence, the biological activity of the binding molecules, *e.g.* antibodies identified here suggests that they have sufficient affinity to make them potential candidates for drug localization to cells expressing the appropriate surface structures of the diseased cell and tissue, respectively. This targeting and binding to cells could be useful for the delivery of therapeutically or diagnostically active agents and gene therapy/gene delivery. Molecules/particles with an antibody of the invention would bind specifically to cells/tissues expressing the variant form of the pathological protein, and therefore could have diagnostic and therapeutic use. Thus, the binding molecule, *e.g.*, antibody or antigen binding fragment thereof of the present invention can be labeled (*e.g.*, fluorescent, radioactive, enzyme, nuclear magnetic, heavy metal) and used to detect specific targets *in vivo* or *in vitro* including "immunochemistry" like assays *in vitro*. *In vivo* they could be used in a manner similar to nuclear medicine imaging techniques to detect tissues, cells, or other material expressing the neoepitope. Thus, in a further embodiment the present invention relates to the use of a binding molecule or an antibody of the present invention or binding fragment thereof for the preparation of a composition for *in vivo* detection of or targeting a therapeutic and/or diagnostic agent to a disorder-associated protein in the brain, detecting, suppressing formation of or reducing pathological protein aggregates or conformations in a subject, for improving cognition or slowing or reversing cognitive decline associated with diseases, or for extra-corporal extraction of pathological compounds or their precursors from body fluids.

[0223] In certain embodiments, antibody polypeptide comprises an amino acid sequence or one or more moieties not normally associated with an antibody. Exemplary modifications are described in more detail below. For example, a single-chain fv antibody fragment of the invention may comprise a flexible linker sequence, or may be modified to add a functional moiety (*e.g.*, PEG, a drug, a toxin, or a label).

[0224] An antibody polypeptide of the invention may comprise, consist essentially of, or consist of a fusion protein. Fusion proteins are chimeric molecules which comprise, for example, an immunoglobulin antigen-binding domain with at least one target binding site, and at least one heterologous portion, *i.e.*, a portion with which it is not naturally linked in

nature. The amino acid sequences may normally exist in separate proteins that are brought together in the fusion polypeptide or they may normally exist in the same protein but are placed in a new arrangement in the fusion polypeptide. Fusion proteins may be created, for example, by chemical synthesis, or by creating and translating a polynucleotide in which the peptide regions are encoded in the desired relationship.

[0225] The term "heterologous" as applied to a polynucleotide or a polypeptide, means that the polynucleotide or polypeptide is derived from a distinct entity from that of the rest of the entity to which it is being compared. For instance, as used herein, a "heterologous polypeptide" to be fused to an antibody, or an antigen-binding fragment, variant, or analog thereof is derived from a non-immunoglobulin polypeptide of the same species, or an immunoglobulin or non-immunoglobulin polypeptide of a different species.

[0226] As discussed in more detail elsewhere herein, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention may further be recombinantly fused to a heterologous polypeptide at the N- or C-terminus or chemically conjugated (including covalent and non-covalent conjugations) to polypeptides or other compositions. For example, antibodies may be recombinantly fused or conjugated to molecules useful as labels in detection assays and effector molecules such as heterologous polypeptides, drugs, radionuclides, or toxins. *See, e.g.*, PCT publications WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. Patent No. 5,314,995; and EP 396,387.

[0227] Antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can be composed of amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, *i.e.*, peptide isosteres, and may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. Antibodies may be modified by natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in the antibody, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini, or on moieties such as carbohydrates. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given antibody. Also, a given antibody may contain many types of modifications. Antibodies may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic antibodies may result from posttranslation natural processes or may be made by synthetic methods.

Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphotidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. (*See, e.g., Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol 182*:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci 663*:48-62 (1992)).

[0228] The present invention also provides for fusion proteins comprising an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof, and a heterologous polypeptide. In one embodiment, a fusion protein of the invention comprises, consists essentially of, or consists of, a polypeptide having the amino acid sequence of any one or more of the VH regions of an antibody of the invention or the amino acid sequence of any one or more of the VL regions of an antibody of the invention or fragments or variants thereof, and a heterologous polypeptide sequence. In another embodiment, a fusion protein for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein comprises, consists essentially of, or consists of a polypeptide having the amino acid sequence of any one, two, three of the VH-CDRs of an antibody, or fragments, variants, or derivatives thereof, or the amino acid sequence of any one, two, three of the VL-CDRs of an antibody, or fragments, variants, or derivatives thereof, and a heterologous polypeptide sequence. In one embodiment, the fusion protein comprises a polypeptide having the amino acid sequence of a VH-CDR3 of an antibody of the present invention, or fragment, derivative, or variant thereof, and a heterologous polypeptide sequence, which fusion protein specifically binds to at least one neoepitope of a disorder-associated protein. In another embodiment, a fusion protein comprises a polypeptide having the amino acid sequence of at least one VH region of an antibody of the invention and the amino acid sequence of at least one VL region of an antibody of the invention or fragments, derivatives or variants thereof, and a heterologous

polypeptide sequence. Preferably, the VH and VL regions of the fusion protein correspond to a single source antibody (or scFv or Fab fragment) which specifically binds at least one neoepitope of a disorder-associated protein. In yet another embodiment, a fusion protein for use in the diagnostic and treatment methods disclosed herein comprises a polypeptide having the amino acid sequence of any one, two, three or more of the VH CDRs of an antibody and the amino acid sequence of any one, two, three or more of the VL CDRs of an antibody, or fragments or variants thereof, and a heterologous polypeptide sequence. Preferably, two, three, four, five, six, or more of the VH-CDR(s) or VL-CDR(s) correspond to single source antibody (or scFv or Fab fragment) of the invention. Nucleic acid molecules encoding these fusion proteins are also encompassed by the invention.

[0229] Exemplary fusion proteins reported in the literature include fusions of the T cell receptor (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon *et al.*, *Nature 337*:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature 339*:68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell* Biol. *USA 9*:347-353 (1990); and Byrn *et al.*, *Nature 344*:667-670 (1990)); L-selectin (homing receptor) (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol. 110*:2221-2229 (1990); and Watson *et al.*, *Nature 349*:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell 61*:1303-1313 (1990)); CD28 and B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med. 173*:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med. 174*:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell 66*:1133-1144 (1991)); TNF receptor (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol. 27*:2883-2886 (1991); and Peppel *et al.*, *J. Exp. Med. 174*:1483-1489 (1991)); and IgE receptor a (Ridgway and Gorman, *J. Cell. Biol. Vol. 115*, Abstract No. 1448 (1991)).

[0230] As discussed elsewhere herein, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention may be fused to heterologous polypeptides to increase the *in vivo* half life of the polypeptides or for use in immunoassays using methods known in the art. For example, in one embodiment, PEG can be conjugated to the antibodies of the invention to increase their half-life *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine 16*:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev. 54*:531 (2002); or Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions 30*:512 (2002).

[0231] Moreover, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can be fused to marker sequences, such as a peptide to facilitate their purification or detection. In preferred embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton

Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86*:821-824 (1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Other peptide tags useful for purification include, but are not limited to, the "HA" tag, which corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein (Wilson *et al.*, *Cell 37*:767 (1984)) and the "flag" tag.

[0232] Fusion proteins can be prepared using methods that are well known in the art (see for example US Patent Nos. 5,116,964 and 5,225,538). The precise site at which the fusion is made may be selected empirically to optimize the secretion or binding characteristics of the fusion protein. DNA encoding the fusion protein is then transfected into a host cell for expression.

[0233] Antibodies of the present invention may be used in non-conjugated form or may be conjugated to at least one of a variety of molecules, *e.g.*, to improve the therapeutic properties of the molecule, to facilitate target detection, or for imaging or therapy of the patient. Antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention can be labeled or conjugated either before or after purification, when purification is performed.

[0234] In particular, antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention may be conjugated to therapeutic agents, prodrugs, peptides, proteins, enzymes, viruses, lipids, biological response modifiers, pharmaceutical agents, or PEG.

[0235] Conjugates that are immunotoxins including conventional antibodies have been widely described in the art. The toxins may be coupled to the antibodies by conventional coupling techniques or immunotoxins containing protein toxin portions can be produced as fusion proteins. The antibodies of the present invention can be used in a corresponding way to obtain such immunotoxins. Illustrative of such immunotoxins are those described by Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 and by Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

[0236] The above described fusion protein may further comprise a cleavable linker or cleavage site for proteinases. These spacer moieties, in turn, can be either insoluble or soluble (Diener *et al.*, Science 231 (1986), 148) and can be selected to enable drug release from the antigen at the target site. Examples of therapeutic agents which can be coupled to the antibodies and antigens of the present invention for immunotherapy are drugs,

radioisotopes, lectins, and toxins. The drugs with which can be conjugated to the antibodies and antigens of the present invention include compounds which are classically referred to as drugs such as mitomycin C, daunorubicin, and vinblastine. In using radioisotopically conjugated antibodies or antigens of the invention for, *e.g.*, immunotherapy, certain isotopes may be more preferable than others depending on such factors as leukocyte distribution as well as stability and emission. Depending on the autoimmune response, some emitters may be preferable to others. In general, α and ß particle emitting radioisotopes are preferred in immunotherapy. Preferred are short range, high energy a emitters such as ^{212}Bi. Examples of radioisotopes which can be bound to the antibodies or antigens of the invention for therapeutic purposes include, but are not limited to ^{125}I, ^{131}I, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{64}Cu, ^{212}Bi, ^{212}At, ^{211}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd and ^{188}Re. Other therapeutic agents which can be coupled to the binding molecule, *e.g.*, antibody or antigen binding fragment thereof of the invention, as well as ex vivo and *in vivo* therapeutic protocols, are known, or can be easily ascertained, by those of ordinary skill in the art. Wherever appropriate the person skilled in the art may use a polynucleotide of the invention encoding any one of the above described antibodies, antigens or the corresponding vectors instead of the proteinaeous material itself.

[0237] Those skilled in the art will appreciate that conjugates may also be assembled using a variety of techniques depending on the selected agent to be conjugated. For example, conjugates with biotin are prepared *e.g.* by reacting a binding polypeptide with an activated ester of biotin such as the biotin N-hydroxysuccinimide ester. Similarly, conjugates with a fluorescent marker may be prepared in the presence of a coupling agent, *e.g.* those listed herein, or by reaction with an isothiocyanate, preferably fluorescein-isothiocyanate. Conjugates of the antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention are prepared in an analogous manner.

[0238] The present invention further encompasses antibodies, or antigen-binding fragments, variants, or derivatives thereof of the invention conjugated to a diagnostic or therapeutic agent. The antibodies can be used diagnostically to, for example, monitor the development or progression of a neurological disease as part of a clinical testing procedure to, *e.g.*, determine the efficacy of a given treatment and/or prevention regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof to a detectable substance. Examples of detectable substances include

various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive materials, positron emitting metals using various positron emission tomographies, and nonradioactive paramagnetic metal ions. *See, e.g.*, U.S. Pat. No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In or ^{99}Tc.

[0239] An antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof also can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt and oxalate ester.

[0240] One of the ways in which an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof can be detectably labeled is by linking the same to an enzyme and using the linked product in an enzyme immunoassay (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons 2*:1-7 (1978)); Voller *et al.*, *J. Clin. Pathol. 31*:507-520 (1978); Butler, J. E., *Meth.* Enzymol. *73*:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kgaku Shoin, Tokyo (1981). The enzyme, which is bound to the antibody will react with an appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alpha-glycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase,

ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and acetylcholinesterase. Additionally, the detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

[0241] Detection may also be accomplished using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactively labeling the antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof, it is possible to detect the antibody through the use of a radioimmunoassay (RIA) (*see*, for example, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (March, 1986)), which is incorporated by reference herein). The radioactive isotope can be detected by means including, but not limited to, a gamma counter, a scintillation counter, or autoradiography.

[0242] An antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as 152Eu, or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

[0243] Techniques for conjugating various moieties to an antibody, or antigen-binding fragment, variant, or derivative thereof are well known, *see, e.g.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev. 62*:119-58 (1982).

[0244] In certain embodiments, a moiety that enhances the stability or efficacy of a binding molecule, *e.g.*, a binding polypeptide, *e.g.*, an antibody or immunospecific fragment thereof can be conjugated. For example, in one embodiment, PEG can be conjugated to the

binding molecules of the invention to increase their half-life *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine 16*:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev. 54*:531 (2002); or Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions 30*:512 (2002).

VII. Compositions and Methods of Use

[0245] Moreover, the present invention relates to compositions comprising the aforementioned binding molecule, *e.g.*, antibody or antigen binding fragment thereof of the present invention or chemical derivatives thereof, or the polynucleotide, vector or cell of the invention. The composition of the present invention may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier. The term "chemical derivative" describes a molecule that contains additional chemical moieties that are not normally a part of the base molecule. Such moieties may improve the solubility, half-life, absorption, etc. of the base molecule. Alternatively the moieties may attenuate undesirable side effects of the base molecule or decrease the toxicity of the base molecule. Furthermore, the pharmaceutical composition of the present invention may comprise further agents such as interleukins or interferons depending on the intended use of the pharmaceutical composition. For example, for use in the treatment of Alzheimer's disease the additional agent may selected from the group consisting of small organic molecules, anti-Abeta antibodies, and combinations thereof. Hence, in a particular preferred embodiment the present invention relates to the use of the binding molecule, *e.g.*, antibody or antigen binding fragment thereof of the present invention or of a binding molecule having substantially the same binding specificities of any one thereof, the polynucleotide, the vector or the cell of the present invention for the preparation of a pharmaceutical or diagnostic composition for treating or preventing the progression of Alzheimer's disease; for the amelioration of symptoms associated with Alzheimer's disease; for diagnosing or screening a subject for the presence of Alzheimer's disease or for determining a subject's risk for developing Alzheimer's disease. Said pharmaceutical composition can be designed to be administered intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally, intranasally, parenterally or as an aerosol; see also *infra*.

[0246] Hence, in one embodiment the present invention relates to a method of treating a neurological disorder characterized by abnormal accumulation and/or deposition of a protein in the central nervous system, which method comprises administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of any one of the afore-described binding

molecules, antibodies, antigens, polynucleotides, vectors or cells of the instant invention. The term "neurological disorder" includes but is not limited to Alzheimer's Disease, mild cognitive impairment, fronto-temporal dementia, Lewy-body disease, Parkinson's disease, Pick's disease, Binswanger's disease; congophilic amyloid angiopathy, cerebral amyloid angiopathy, Down's syndrome, multi-infarct dementia, Huntington's Disease, Creutzfeldt-Jakob Disease, AIDS dementia complex, depression, anxiety disorder, phobia, Bell's Palsy, epilepsy, encephalitis, multiple sclerosis; neuromuscular disorders, neurooncological disorders, brain tumors, neurovascular disorders including stroke, neuroimmunological disorders, neurootological disease, neurotrauma including spinal cord injury, pain including neuropathic pain, pediatric neurological and neuropsychiatric disorders, sleep disorders, Tourette syndrome, mild cognitive impairment, vascular dementia, multi-infarct dementia, cystic fibrosis, Gaucher's disease other movement disorders and disease of the central nervous system (CNS) in general. Unless stated otherwise, the terms neurodegenerative, neurological or neuropsychiatric are used interchangeably herein.

[0247] In the sense of the present invention, a method is disclosed for characterizing human antibodies for a large number of diseases and to also produce said antibodies subsequently in order to employ them diagnostically, therapeutically, or preventively in such patients whose immune system did not react with a corresponding immune response to the development of the pathology of the disease. In particular, this will have to be expected in diseases occurring at an advanced age because, as is known, the reactivity of the immune system continuously and significantly decreases as the age increases. In these cases, therapeutically or preventively active antibodies could compensate the age-related restrictions of the immune system with respect to blocking the enrichment of endogenous pathophysiological protein variants and could thus contribute to a better state of health at an advanced age. Thus, the medical uses of the present invention are particularly applicable for the above-described patient group, for example at the age of 60, 65, 70, 75, 80 or older and in principle concern all diseases manifesting themselves in form of derailment of any kind, like for example endoproteolysis, conformation alterations, alterations of the post-translational modifications, somatic mutations, or combinations thereof, phenotypically by means of developing pathophysiological variants of endogenous protein. In the sense of the present invention, pathophysiological variants are considered to be variants containing pathological neoepitopes that deviate from the physiology, see *supra*.

[0248] In particular, the therapeutic applications include tumor diseases, inflammatory diseases and diseases of the central nervous system, like Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Pick's disease, Dementia with Lewy Bodies, Prion diseases including Creutzfeldt-Jakob disease, progressive supranuclear palsy, multiple system atrophy, corticobasal degeneration, frontotemporal degeneration with Parkinsonism liked to chromosome 17 Huntington's disease, frontotemporal dementia, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis Dutch type and Icelandic type, spinocerebellar ataxia and amyotrohic lateral sclerosis as well as glaucoma, inclusion body myositis, familial amyloid polyneuropathy and amyloidoses comprising fibrillary proteins derived from at least one of the following precursor proteins SAA (Serum-Amyloid-Protein A), AL (k or l-light chains of Immunoglobulins), AH (g1 Ig-heavy chains), ATTR (Transthyretin, Serum-Prealbumin), AApo-A-1 (Apolipoprotein A1), AApoA2 (Apolipoprotein A2), AGel (Gelsolin), ACys (Cystatin C), ALys (Lysozyme), AFib (Fibrinogen), Beta-amyloid (Amyloid precursor protein), Beta-amyloid2M (beta2-microglobulin), APrP (Prion protein), ACal (Procalcitonin), AIAPP (islet amyloid polypeptide); APro (Prolactin), AIns (Insulin); AMed (Lactadherin); Aker (Kerato-epithelin); ALac (Lactoferrin), Abri (AbriPP), ADan (ADanPP); or AANP (Atrial natriuretical peptide), (Skovronsky at al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006; 1:151-70; Buxbaum, Curr Opin Rheumatol 2003; 16: 67-75.

[0249] A particular advantage of the therapeutic approach of the present invention lies in the fact that antibodies derived from B cells or B memory cells from a healthy preclinical or clinically unusually stable organism are, with a certain probability, capable of preventing a clinically manifest disease, or of diminishing the risk of the occurrence of a clinically manifest disease, or of delaying the moment of the occurrence of a clinically manifest disease. Typically, such antibodies also have already successfully gone through somatic maturation, *i.e.* the optimization with respect to selectivity and effectiveness in the high affinity binding to the target molecule by means of somatic variation of the variable regions of the antibody.

[0250] The knowledge that such cells *in vivo*, *e.g.* in a human, have not been activated by means of related or other physiological proteins or cell structures in the sense of an autoimmunological or allergic reaction is also of great medical importance since this signifies a considerably increased chance of successfully living through the clinical test

phases. So to speak, efficiency, acceptability and tolerability have already been demonstrated before the preclinical development of the prophylactic or therapeutic antibody in at least one human subject. It can thus be expected that, with a procedure according to the present invention, both the target structure-specific efficiency of an antibody as therapeutic agent and its decreased probability of side effects significantly increase its clinical probability of success.

[0251] From the foregoing, it is evident that the present invention encompasses any use of a disease specific binding molecule comprising at least one CDR of the above described antibody, in particular for diagnosing and/or treatment of a disorder related to Alzheimer's disease and Abeta deposition, respectively. Preferably, said binding molecule is an antibody of the present invention or an immunoglobulin chain thereof. In addition, the present invention relates to anti-idiotypic antibodies of any one of the mentioned antibodies described hereinbefore. These are antibodies or other binding molecules which bind to the unique antigenic peptide sequence located on an antibody's variable region near the antigen binding site.

[0252] In another embodiment the present invention relates to a diagnostic composition comprising any one of the above described binding molecules, antibodies, antigen-binding fragments, polynucleotides, vectors or cells of the invention and optionally suitable means for detection such as reagents conventionally used in immuno or nucleic acid based diagnostic methods. The antibodies of the invention are, for example, suited for use in immunoassays in which they can be utilized in liquid phase or bound to a solid phase carrier. Examples of immunoassays which can utilize the antibody of the invention are competitive and non-competitive immunoassays in either a direct or indirect format. Examples of such immunoassays are the radioimmunoassay (RIA), the sandwich (immunometric assay), flow cytometry and the Western blot assay. The antigens and antibodies of the invention can be bound to many different carriers and used to isolate cells specifically bound thereto. Examples of well known carriers include glass, polystyrene, polyvinyl chloride, polypropylene, polyethylene, polycarbonate, dextran, nylon, amyloses, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for the purposes of the invention. There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes, colloidal metals, fluorescent compounds, chemiluminescent

compounds, and bioluminescent compounds; see also the embodiments discussed hereinabove.

[0253] By a further embodiment, the binding molecules, in particular antibodies of the present invention may also be used in a method for the diagnosis of a disorder in an individual by obtaining a body fluid sample from the tested individual which may be a blood sample, a lymph sample or any other body fluid sample and contacting the body fluid sample with an antibody of the instant invention under conditions enabling the formation of antibody-antigen complexes. The level of such complexes is then determined by methods known in the art, a level significantly higher than that formed in a control sample indicating the disease in the tested individual. In the same manner, the specific antigen bound by the antibodies of the invention may also be used. Thus, the present invention relates to an *in vitro* immunoassay comprising the binding molecule, *e.g.*, antibody or antigen binding fragment thereof of the invention.

[0254] In this context, the present invention also relates to means specifically designed for this purpose. For example, a protein- or antibody-based array may be used, which is for example loaded with either antigens derived from the mentioned disorder-associated protein and containing the neoepitope in order to detect autoantibodies which may be present in patients suffering from, *e.g.*, a neurological disorder, in particular Alzheimer's disease, or with antibodies or equivalent antigen-binding molecules of the present invention which specifically recognize any one of those proteins. For example, antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis has been reported by Hueber *et al.*, Arthritis Rheum. 52 (2005), 2645-2655. Design of microarray immunoassays is summarized in Kusnezow *et al.*, Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Accordingly, the present invention also relates to microarrays loaded with binding molecules or antigens identified in accordance with the present invention.

[0255] The present invention also provides a pharmaceutical and diagnostic, respectively, pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the above described ingredients, *e.g.* binding molecule, antibody or binding fragment thereof, antigen, polynucleotide, vector or cell of the present invention. Associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration. In addition or alternatively the kit comprises reagents and/or instructions for use in appropriate

diagnostic assays. The composition, *e.g.* kit of the present invention is of course particularly suitable for the diagnosis, prevention and treatment of a disorder which is accompanied with the presence of a disorder-associated protein as defined above, especially amyloidosis, and in particular applicable for the treatment of Alzheimer's disease (AD).

[0256] The terms "treatment", "treating" and the like are used herein to generally mean obtaining a desired pharmacological and/or physiological effect. The effect may be prophylactic in terms of completely or partially preventing a disease or symptom thereof and/or may be therapeutic in terms of partially or completely curing a disease and/or adverse effect attributed to the disease. The term "treatment" as used herein covers any treatment of a disease in a mammal, particularly a human, and includes: (a) preventing the disease from occurring in a subject which may be predisposed to the disease but has not yet been diagnosed as having it; (b) inhibiting the disease, *e.g.* arresting its development; or (c) relieving the disease, *e.g.* causing regression of the disease.

[0257] Furthermore, the term "subject" or "patient" refers to a mammal, preferably a human, in need of treatment for a condition, disorder or disease.

[0258] The pharmaceutical compositions of the present invention can be formulated according to methods well known in the art; see for example Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Examples of suitable pharmaceutical carriers are well known in the art and include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions etc. Compositions comprising such carriers can be formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, *e.g.*, by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical or intradermal administration. Aerosol formulations such as nasal spray formulations include purified aqueous or other solutions of the active agent with preservative agents and isotonic agents. Such formulations are preferably adjusted to a pH and isotonic state compatible with the nasal mucous membranes. Formulations for rectal or vaginal ad-ministration may be presented as a suppository with a suitable carrier.

[0259] Furthermore, whereas the present invention includes the now standard (though fortunately infrequent) procedure of drilling a small hole in the skull to administer a drug of

the present invention, in a preferred aspect, the binding molecule, especially antibody or antibody based drug of the present invention can cross the blood-brain barrier, which allows for intravenous or oral administration.

[0260] The dosage regimen will be determined by the attending physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. A typical dose can be, for example, in the range of 0.001 to 1000 μg (or of nucleic acid for expression or for inhibition of expression in this range); however, doses below or above this exemplary range are envisioned, especially considering the aforementioned factors. Generally, the dosage can range, *e.g.*, from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg (e.g., 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1mg/kg, 2 mg/kg, etc.), of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg, preferably at least 1 mg/kg. Doses intermediate in the above ranges are also intended to be within the scope of the invention. Subjects can be administered such doses daily, on alternative days, weekly or according to any other schedule determined by empirical analysis. An exemplary treatment entails administration in multiple dosages over a prolonged period, for example, of at least six months. Additional exemplary treatment regimes entail administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months. Exemplary dosage schedules include 1-10 mg/kg or 15 mg/kg on consecutive days, 30 mg/kg on alternate days or 60 mg/kg weekly. In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated.. Progress can be monitored by periodic assessment. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may

also be present such as, for example, antimicrobials, anti-oxidants, chelating agents, and inert gases and the like. Furthermore, the pharmaceutical composition of the invention may comprise further agents such as dopamine or psychopharmacologic drugs, depending on the intended use of the pharmaceutical composition. Furthermore, the pharmaceutical composition may also be formulated as a vaccine, for example, if the pharmaceutical composition of the invention comprises an anti-Aβ antibody for passive immunization.

[0261] In addition, co-administration or sequential administration of other agents may be desirable. A therapeutically effective dose or amount refers to that amount of the active ingredient sufficient to ameliorate the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD_{50} (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio between therapeutic and toxic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD_{50}/ED_{50}. Preferably, the therapeutic agent in the composition is present in an amount sufficient to restore normal behavior and/or cognitive properties in case of Alzheimer's disease.

[0262] The pharmaceutical compositions in accordance with the present invention can preferably be used for the treatment of neurological disorders including but not limited to Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Pick's disease, Dementia with Lewy Bodies, Prion diseases including Creutzfeldt-Jakob disease, progressive supranuclear palsy, multiple system atrophy, corticobasal degeneration, frontotemporal degeneration with Parkinsonism liked to chromosome 17 Huntington's disease, frontotemporal dementia, cerebral amyloid angiopathy, mild cognitive impairment, Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis Dutch type and Icelandic type, spinocerebellar ataxia, amyotrohic lateral sclerosis, Bell's Palsy, epilepsy, encephalitis, neuromuscular disorders, glaucoma, inclusion body myositis, familial amyloid polyneuropathy, amyloidoses comprising fibrillary proteins derived from at least one of the following precursor proteins SAA (Serum-Amyloid-Protein A), AL (k or l-light chains of Immunoglobulins), AH (g1 Ig-heavy chains), ATTR (Transthyretin, Serum-Prealbumin), AApo-A-1 (Apolipoprotein A1), AApoA2 (Apolipoprotein A2), AGel (Gelsolin), ACys (Cystatin C), ALys (Lysozyme), AFib (Fibrinogen), Beta-amyloid (Amyloid precursor protein), Beta-amyloid2M (beta2-microglobulin), APrP (Prion protein), ACal (Procalcitonin), AIAPP (islet amyloid polypeptide); APro (Prolactin), AIns (Insulin);

AMed (Lactadherin); Aker (Kerato-epithelin); ALac (Lactoferrin), Abri (AbriPP), ADan (ADanPP); or AANP (Atrial natriuretical peptide), (Skovronsky at al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006; 1:151-70; Buxbaum, Curr Opin Rheumatol 2003; 16: 67-75, neuro-oncology, neuro-immunology, neuro-otology pain, pediatric neurology, phobia, affective disorders, sleep disorders, Tourette Syndrome, other movement disorders and disease of the central nervous system (CNS) in general.

[0263] These and other embodiments are disclosed and encompassed by the description and examples of the present invention. Further literature concerning any one of the materials, methods, uses and compounds to be employed in accordance with the present invention may be retrieved from public libraries and databases, using for example electronic devices. For example the public database "Medline" may be utilized, which is hosted by the National Center for Biotechnology Information and/or the National Library of Medicine at the National Institutes of Health. Further databases and web addresses, such as those of the European Bioinformatics Institute (EBI), which is part of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) are known to the person skilled in the art and can also be obtained using internet search engines. An overview of patent information in biotechnology and a survey of relevant sources of patent information useful for retrospective searching and for current awareness is given in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

[0264] The above disclosure generally describes the present invention. Unless otherwise stated, a term as used herein is given the definition as provided in the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revised 2000 and reprinted 2003, ISBN 0 19 850673 2. Several documents are cited throughout the text of this specification. Full bibliographic citations may be found at the end of the specification immediately preceding the claims. The contents of all cited references (including literature references, issued patents, published patent applications as cited throughout this application and manufacturer's specifications, instructions, etc) are hereby expressly incorporated by reference; however, there is no admission that any document cited is indeed prior art as to the present invention.

[0265] A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples which are provided herein for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLES

[0266] The examples which follow further illustrate the invention, but should not be construed to limit the scope of the invention in any way. Detailed descriptions of conventional methods, such as those employed herein can be found in the cited literature; see also "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Ed. ed by Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

[0267] The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of cell biology, cell culture, molecular biology, transgenic biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the skill of the art. For further elaboration of general techniques useful in the practice of this invention, the practitioner can refer to standard textbooks and reviews in cell biology and tissue culture; see also the references cited in the examples. General methods in molecular and cellular biochemistry can be found in such standard textbooks as Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I and II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel *et al.*, eds.); and Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.*, eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); and Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Reagents,

cloning vectors and kits for genetic manipulation referred to in this disclosure are available from commercial vendors such as BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, and ClonTech.General techniques in cell culture and media collection are outlined in Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); and Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

[0268] The following experiments are illustrated and described with respect to antibody NI-101.11. However, the other antibodies of the NI 101 series, in particular NI 101.10 are structurally similar and thus may be expected to provide comparable results.

Supplementary Methods

Memory B cell display

[0269] Clinically carefully selected human subjects who are characterized by unusually positive clinical courses, *e.g.* absence of clinical signs of disease in the presence of risk factors, or stable courses of mild or prodromal signs with no disease development, or long-term non-progressors are recruited to provide peripheral blood lymphocytes as the starting material for the isolation of memory B cells. The strategy is based upon the concept established in infection immunology that a subject's memory B cell pool preserves the antibody specificities and possibly also antibody frequencies generated during previous antigen encounters (McHeyzer-Williams and Ahmed Curr. Opin. Immunol. 11 (1999), 172-179; Bernasconi *et al.*, Science 298 (2002), 2199-202; Traggiai *et al.*, Nat. Med. 10 (2004), 871-875). This concept was developed to explain adaptive immunity against infectious agents, as well as for the description of antibody-mediated immunity following a primary infection. According to this theory, the entire complement of antibodies against all antigens that had had induced an antibody response in the subject's history, either naturally or upon vaccination, should be fully represented within the memory B cell pool. In accordance with the present invention this theory is applied to *endogenous* antigens generated as a result of *abnormal aggregation or conformation* of an otherwise physiological relevant protein, and that, as such, is not subject to the physiological

immunologic tolerance, and, thus, can acquire antigenic properties and induce an immune response against the conformational *neo-epitopes* (*neoepitopes*).

[0270] Memory B cells are isolated with surface markers including the pan B cell marker CD22, combined with negative selection of antigen-inexperienced B cells that expressed IgM, IgD, IgE, and IgA. With this technique, approximately 10.000 to 150.000 memory B cells can be obtained from 30ml of human blood. These are immortalized, for example with Epstein Barr Virus, and cultured oligo-clonally on irradiated human fibroblast feeder layers (Zubler *et al.*, J Immunol. 134 (1985), 3662-3668; Traggiai *et al.*, Nat. Med. 10 (2004), 871-875). To improve transformation and immortalization efficacy of antibody-secreting memory B cells, CpG 2006 which mimics the activities of bacterial un-methylated CpG-dinucleotides (Hartmann and Krieg J Immunol 164(2) (2000), 944-953) can be used.

Experimental protocol:

[0271] Selection of B cells from the bulk of PBL was performed using the MACS technology and CD22 microbeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). PBL were labeled with MACS anti human CD22, phycoerythrin-conjugated anti human IgD and APC-conjugated antibodies anti human IgM, IgA, CD3, CD8, CD56 (Becton Dickinson, Basel, Switzerland). CD22-positive cells were isolated using LS columns and the Midi MACS device (Miltenyi) followed by selection of phycoerythrin- and APC-negative cells using a MoFlo cell sorter (Dako, Fort Collins, USA). CD22-positive, IgM-, IgD-, IgA–, and IgE-negative B cells were then incubated with Epstein Barr Virus containing supernatant obtained from B95-8 cells and CpG 2006 (Sigma, Buchs, Switzerland) at a concentration of 2.5mg/l in B cell medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Perbio, Lausanne, Switzerland). 5-50 cells were seeded per well in Costar round bottom 96 well plates (Corning, Vitaris, Baar, Switzerland) in B cell medium on 30.000 irradiated human PBL prepared from voluntary donors. Memory B cell cultures were maintained at 37°C and 5% CO_2 in a humidified cell culture incubator for 2-4 weeks after which time the conditioned medium of the cultures was assayed in ELISA and on tissue arrays.

Antibody screening

[0272] Antibodies in conditioned media are screened for binding to pathological epitopes including protein aggregates and abnormal, pathologically relevant structures on tissue sections obtained from human patients with pathologically confirmed diagnoses including, but not restricted to, Alzheimer's disease, or obtained from tissue sections of transgenic mouse models of human disease, or from tissue sections obtained from animal models of human disease including aged non-human primates, or by ELISA of aggregated synthetic peptide preparations. Abnormal, pathologic structures in the sense of this invention include, but are not restricted to, ß-amyloid plaques, neurofibrillary tangles, alpha-synuclein aggregates in Lewy bodies, and protein aggregates deposited in dystrophic neurites. Human tissues are also used to exclude cross-reactivities of antibodies with normal cellular or supercellular tissue structures. Selected antibodies are further analyzed for class and light chain subclass determination. Selected pathology-relevant antibody messages from memory B cell cultures are transcribed by using RT-PCR, cloned and combined into expression vectors for recombinant production.

Experimental protocol:

[0273] Screening of B cell conditioned medium using microtiter-compatible tissue microarrays.

Array production

[0274] Paraffin-embedded human post-mortem Alzheimer's disease brain tissues were cut into rods of 1-2 mm in diameter and 10mm in length. Four rods were embedded vertically in paraffin to form a square fitting the microtiter format of 9 by 9 mm. 5 µm tissue slices were cut from this assembly with a microtome and two slices were mounted adjacent to each other onto glass slides resulting in an assembly of 2 by 4 rods that fit the 96-well microtiter format. Alternatively, tissues from APP transgenic mice were used to prepare the tissue arrays.

B cell screening

[0275] Conditioned medium from memory B cell cultures was transferred onto the tissue array slides using a multichannel pipette and incubated for 2 h at room temperature. After a washing step the binding of human antibodies to tissue sections was analyzed using Cy

3-conjugated secondary antibodies to human IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK). Analysis of fluorescence was performed on an inverted fluorescence microscope (Leica, Heerbrugg, Switzerland).

ELISA

[0276] 96 well half area Microplates (Corning) were coated with synthetic Abeta-peptide at a standard concentration of 1 µg/ml in coating buffer (15mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.42) overnight at 4°C. Plates were washed and non-specific binding sites were blocked for 1h at RT with PBS containing 2% BSA (Sigma, Buchs, Switzerland). B cell conditioned medium was transferred from memory B cell culture plates to ELISA plates and was incubated for 2 h at room temperature. Binding of human antibodies was determined using horse radish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-human IgG polyclonal antibodies (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK) followed by measurement of HRP activity in a standard colorimetric assay.

Molecular cloning of antibodies displaying specificity of interest

[0277] Living B cells of selected memory B cell cultures are harvested using a cell sorter. mRNA is prepared and immunoglobulin heavy and light chain sequences are obtained using Ig-framework specific primers for all human variable heavy and light chain framework 1 (FR1) families as 5' primers in combination with primers specific for all human J-H segments as 3' primers (Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991)., 581-597). Alternatively, single-cell RT-PCR of single sorted cells from the memory B cell culture can be used as source of Ig heavy and light chain sequences (Babcook *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek *et al.*, J. Immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella *et al.*, Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens, *et al.*, J. Immunol. 171 (2003), 2725-2733). Single cell sorting preserves the correct pairing of the immunoglobulin heavy and light chains of the antibody clones originally produced in the B cell culture.

[0278] Identification of the antibody clone with the desired specificity is performed by re-screening on microtiter compatible tissue microarray and ELISA upon recombinant expression of complete antibodies. Recombinant expression of complete IgG1 antibodies is achieved upon insertion of the variable heavy and light chain sequences "in the correct reading frame" into expression vectors that complement the variable region sequence with a sequence encoding a signal peptide at the 5-prime end and at the 3'-end with a sequence

encoding the appropriate constant domain(s). To that end the primers contained restriction sites designed to facilitate cloning of the variable heavy and light chain sequences into antibody expression vectors. Heavy chain immunoglobulin are expressed by inserting the immunoglobulin heavy chain RT-PCR product in frame into a heavy chain expression vector bearing a signal peptide and the constant domains of human immunoglobulin. Kappa light chain immunoglobulin is expressed by inserting the kappa light chain RT-PCR-product in frame into a light chain expression vector providing a signal peptide and the constant domain 1 of human kappa light chain immunoglobulin. Alternatively, lambda light chain immunoglobulin is expressed by inserting the lambda light chain RT-PCR-product in frame into a lambda light chain expression vector providing a signal peptide and the constant domain 1 of human lambda light chain immunoglobulin.

[0279] Functional recombinant monoclonal antibodies are obtained upon co-transfection into HEK 293 cells (or any other appropriate recipient cell line) of a Ig-heavy–chain expression vector and a kappa or lambda Ig-light–chain expression vector. Recombinant human monoclonal antibody is subsequently purified from the conditioned medium using a standard Protein A column purification. Recombinant human monoclonal antibody can be produced in unlimited quantities using either transiently or stably transfected cells. Cell lines producing recombinant human monoclonal antibody can be established either by using the Ig-expression vectors directly or by re-cloning of Ig-variable regions into different expression vectors. Derivatives such as F(ab), F(ab)2 and scFv can also be generated from these Ig-variable regions.

Experimental protocol:

RT-PCR of bulk B cells

[0280] Living cells as identified by their forward- and sideward light scattering properties of selected memory B cell cultures were sorted in aliquots of 100-2000 cells directly in 0.2 ml PCR tubes filled with 20µl of RNAlater (Ambion, Huntingdon, UK) using a MoFlo cell sorter. mRNA was prepared using the mRNA-Direct Micro Kit (Dynal, Invitrogen, Basel, Switzerland). cDNA was prepared using the "RT for PCR" Kit (Clontech BectonDickinson, Basel, Switzerland) and PCR of immunoglobulin (Ig) heavy and light chain variable sequences was performed using the Advantage 2 PCR Kit (Clontech) using specific primers for all human variable heavy and light chain frame work 1 (FR1) families

as 5' primers in combination with primers specific for the constant domains of human Ig heavy or Ig kappa or Ig lambda light chains as 3' primers. Primers were purchased from Microsynth (Balgach, Switzerland).

[0281] A signal peptide that was used in all expression vectors was derived from the human immunoglobulin kappa light chain family 1 L5 sequence (MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRC; SEQ ID NO: 2) as described at V-Base and designed to provide the restriction site Xba 1 in order to facilitate the cloning of PCR amplified variable regions

(ATGGACATGCGGGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCTAGATGC;

SEQ ID NO: 1). Xba1 was introduced by silent mutagenesis. As a 3' restriction site used for the cloning of variable heavy chain regions the restriction site Sal1 was introduced into C1 of IgG1provided by the vector. Similarly, the restriction site BsiW1 was introduced into C1 of the kappa light chain and Xho1 was introduced into C1 of lambda light chain. Restriction digest of PCR products and ligation into to recipient vectors was performed according to standard procedures. Plasmid DNA was prepared using standard kits (Quiagen, Hombrechtikon, Switzerland). Recipient vectors contained a CMV promoter for the expression of antibody genes in mammalian cells.

Single-cell RT-PCR

[0282] For single cell RT-PCR of Ig heavy and light chain variable regions from cultured B cells a modification of the method described by Owens *et al.* was used (Owens *et al.*, 2003). Single cells were deposited directly into each tube of an array of 0.2 ml PCR tubes using the MoFlo cell sorter. Each tube was prepared to contain 10µl of RT buffer for Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR tubes were shock frozen on dry ice and thawed immediately prior to RT-PCR. cDNA was prepared using random hexamers (Clontech) and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). 1st round PCR of immunoglobulin heavy and light chain variable regions was performed using, as 5' primers, a set of primers that primed in all signal peptides conserved among Ig-variable region families. At the 3' position, single primers specific for the constant region of Ig C1 heavy chain or the Ig kappa- or Ig lambda light chain were used. 2nd round PCR was performed on PCR-products obtained during first round PCR using the primers as described for the bulk B cell RT-PCR. Cloning into recipient vectors was performed accordingly.

Alternative cellular cloning

[0283] Cloning was performed using the standard limited dilution method or by single cell deposition into 96 well culture plates using a cell sorter (MoFlo, Dako, Fort Collins, USA). For limiting dilution, cells of a memory B cell culture were harvested, passed through a 30µm nylon mesh (Falcon, Becton Dickinson, Basel, Switzerland) resuspended in medium and seeded onto 96 well plates or 384 well plates at a concentration of 0.3 cells per well.

[0284] For seeding with the cell sorter, the device was set to deposit one single cell (single 1 mode) per well directly in 96 well plates supplemented with B cell medium. The culture medium was supplemented with medium conditioned by activated T cells. Alternatively, 30.000 irradiated feeder cells were added to the medium.

Sequence analysis of immunoglobulin variable region sequences

[0285] Sequencing of cloned immunoglobulin variable region sequences was performed using primers specific for the CMV promoter present 5' of the inserted Ig variable region sequences in the expression vector. Alternatively, primers that primed in the constant domains of Ig heavy- and light chains were used. Sequences obtained were analyzed and aligned using Vector NTI software (Informax-Invitrogen). Plasmids containing sequences that encoded complete immunoglobulin variable regions in frame with the leader peptide and the constant domain were used for expression.

Expression of functional recombinant monoclonal antibodies

[0286] The antibodies can be produced in sufficient quantities by recombinant expression using technologies known in the art (Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). Recombinant human monoclonal antibody of up to 1 mg was produced upon transient transfection of 293 HEK cells. Recombinant human monoclonal antibody of up to 100 mg was produced upon stable transduction of 293 HEK cells or the murine NSO cells using recombinant lentivirus vectors.

Small scale production of human recombinant antibody by transient transfection

[0287] Ig-heavy chain vector and Ig-light chain vectors were co-transfected into HEK 293 cells using the standard calcium phosphate co-precipitation method. Recombinant antibodies were purified from the medium conditioned by transfected HEK 293 cells using protein A column purification (GE-Healthcare, Otelfingen, Switzerland).

Large scale production of human recombinant antibody by stable transduction

[0288] Here, a lentivirus-based transfection system was employed to generate stably transduced cell lines producing human recombinant antibody (Zufferey *et al.*, J. Virol. 72 (1998), 9873-9880). HEK 293 cells were co-transduced with two distinct lentivectors one bearing an expression cassette for the Ig heavy chain, the other a cassette for the Ig light chain of a recombinant antibody. This method of transduction can be used in a broad range of mammalian cell lines such as CHO and NSO cells.

Validation in transgenic mouse models of human disease

[0289] Transgenic mice were generated as previously described (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging July 28 (2006)) on a hybrid background of C57Bl/6 and DBA2. The test group was backcrossed once to C57Bl/6. Mice were kept under standard housing conditions on a reversed 12h:12h light/dark cycle and had free access to food and water. The treatment groups were balanced for age (24 months at first testing, 26 months at 2nd testing) and gender. Mice are treated with antibodies (3mg/kg body weight) by once weekly intraperitoneal injections over a time period of 2 months resulting in 8 injections per animal.

Behavioral testing in the Y-maze

[0290] The spontaneous alternation rate is assessed using a Y-shaped plastic maze, with 40 x 20 x 10 cm arm sizes. During 5 min sessions, the sequences of arm entries are recorded; alternation was defined as successive entries into the three arms, in overlapping triplet sets. The percent alternation was calculated as the ratio of actual to possible alternations. After 2 months of antibody treatment, the mice are retested in the Y-maze. The experimenters are always kept blind for both treatments and genotypes during the whole experiment.

Blood-brain barrier penetration and binding to abnormal structures in the brain

[0291] To assess whether the selected antibodies or fragments thereof can penetrate the blood-brain barrier and bind to their abnormally aggregated or conformationally altered protein targets in the brain, an effective dose of the antibody is administered systemically, intraperitoneally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously or intranasally to a transgenic animal that is characterized by unphysiological accumulation of the aggregated or conformationally altered protein target in the brain. Binding of the antibody to the

pathology specific structures in the brain is then evaluated by immunostaining with a labeled anti-human Ig secondary antibody followed by standard immunohistochemical detection.

Experimental protocol:

[0292] PS-1/APPswe transgenic model mice for Alzheimer's disease received two peripheral injections of 150µg NI-101.11 at day 1 and day 3. The mice were sacrificed 24 h after the second injection and perfused with PBS. Brains were frozen and tissue slices were prepared from frozen tissue using a cryotome. Presence of human antibody on cryostat sections was assayed by staining with Cy3-labeled anti human IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK). Localization of amyloid plaques was performed by co-staining the cryostat sections with the murine Abeta-specific control antibody 6E10 (available from Covance, Catalog Number SIG-39320) followed by FITC-labeled anti mouse IgG antibody. Alternatively, staining with Cy3-labeled anti human IgG antibody was used alone. Analysis of fluorescence was performed on an inverted fluorescence microscope (Leica).

Reduction of brain pathology

[0293] The effects of antibody treatment on the levels of aggregated or conformationally altered protein targets in the brain is assessed by systemic treatment or targeted brain delivery of the antibody (intracranial, intrathecal or intraventricular) and an unrelated antibody control to transgenic animals with characteristic unphysiological accumulation of the aggregated or conformationally altered protein target in the brain. The treatment effects is evaluated by immunostaining or histochemical staining of the altered or aggregated protein targets and measuring the area covered by such aggregates, aggregate size and aggregate number and biochemical quantification of the concentrations of the protein targets in different brain areas.

Absence of antibody-treatment related side effects

[0294] Potential target related adverse effects of the antibody-treatment will be assessed by systemic administration or targeted brain delivery of the antibody (intracrainial, intrathecal or intraventricular) and an unrelated antibody control to transgenic animals with characteristic unphysiological accumulation of the aggregated or conformationally altered

protein target in the brain. Potential side effects will be evaluated by immunostaining or histochemical staining (*e.g.* Prussian blue for micorhemorrhages, hematoxilin-eosin, activated white blood cells) and biochemical quantification (*e.g.* cytokine levels by ELISA).

Immunofluorescence staining of living cells

[0295] HEK 293 cells were transiently transfected with a vector that expresses human wild type APP fused at the intracellular C-terminus to the yellow fluorescent protein variant Citrine. 24 hours after transfection the cells were incubated with human recombinant antibodies or control antibodies at 4°C for 30 minutes. After a washing step the cell were fixed and surface-bound antibody was detected using Cy-3-labeled secondary antibodies to human or mouse IgG (Jackson ImmunoResearch). Analysis of fluorescence was performed on a confocal microscope (Leica).

Preparation of Abeta fibrils

[0296] Abeta peptide was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Lyophylised peptide was reconstituted in TFA and resuspended in PBS immediately prior to its use as monomeric Abeta in the assays. Abeta fibrils were prepared by incubation of monomeric Abeta1-42 peptide at a concentration of 100µg/ml in PBS at 37°C for 24h. Monomeric Abeta peptide and fibril preparations were also used as substrate to coat ELISA plates.

Western blotting

[0297] Monomeric Abeta peptide was mixed with loading dye, heat denatured and 0.2µg was loaded per lane and separated on a gradient SDS-PAGE. Blots were incubated with primary antibody for 2h. Binding of primary human monoclonal antibody or mouse control antibody 6E10 was revealed using secondary anti human or anti mouse antibodies conjugated with horse radish peroxidase (HRP). Blots were developed using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Switzerland).

Competition of tissue amyloid plaque binding

[0298] Recombinant human NI-101.11 antibody was incubated for 2 h with Abeta peptide preparations. The antibody/Abeta preparations were then used for immunohistochemical staining of brain section obtained from a patient with neuropathologically confirmed Alzheimer's disease. 5 µm cryo-sections were prepared, blocked with 4% BSA, 5% goat serum and 5% horse serum in PBS for 1h at RT and stained with NI-101.11/Abeta preparations for 1 h at room temperature. After a washing step the binding of human antibodies to tissue sections was analyzed using Cy3-conjugated secondary antibodies to human IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). Analysis of fluorescence was performed on an inverted fluorescence microscope (Leica, Heerbrugg, Switzerland).

Example 1

Detection of Human Antibodies against Abnormal Structures Prevalent in Human Brain Diseases

[0299] Antibodies from phenotypically healthy subjects, or clinically unusually stable patients with Alzheimer's disease were tested by immunohistochemistry on brain sections obtained from patients with pathologically confirmed Alzheimer's disease. Fig. 1A demonstrates the presence of antibodies in a clinically unusually stable patient that bind to beta-amyloid plaques as was confirmed by co-staining with a known antibody against human beta-amyloid (antibody 4G8; Fig. 1B). The presence in a healthy human subject of antibodies to neurofibrillary tangles in a tissue section obtained from a patient with Alzheimer's disease is shown in Figure 2A. This result was confirmed by co-staining with a known antibody against human tau (HT7). Figure 3A reveals the presence in a healthy human subject of antibodies against dystrophic neurites in a tissue section obtained from a patient with Alzheimer's disease. Control staining with known antibody against human tau (HT7) is depicted in Figure 3 B. These results demonstrate the presence in phenotypically healthy, or clinically unusually stable patients of antibodies against identifiable pathological structures in human tissue samples with histopathologically confirmed diagnoses.

Example 2

Recombinant Human Antibodies Maintain Specificity to Abnormal Structure *in vivo* and Recognize Conformational Epitope of Disease-Associated Beta-Amyloid Protein in Brain Amyloid Plaques but not the Physiological Precursor or Non-Pathogenic Derivative Thereof

[0300] Antibodies NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13A and NI-101.13B were obtained from clinically unusually stable Alzheimer's disease patients with a significantly reduced rate of cognitive decline. Antibody isolation and recombinant production was performed as specified in supplementary methods.

NI-101.11

[0301] Recombinant NI-101.11 was tested for binding to brain beta-amyloid plaques (Fig. 4). Brain sections obtained from a patient with neuropathologically confirmed Alzheimer's disease were stained at the indicated concentrations. Antibody binding to beta-amyloid plaques with concentrations of 50 pM suggest high affinity binding. The binding of antibody NI-101.11 to beta-amyloid plaques at a concentration of 0.5 nM cannot be competed by addition of excess amounts of linear synthetic N-terminal Abeta-derived polypeptide representing positions 1 to 16 at concentrations of up to 1 µM (Fig. 5). Furthermore, the binding of NI-101.11 to beta-amyloid plaques on brain sections at 8 nM concentration is competed by excess amounts Abeta1-42 fibrils (4 µM) but not of linear synthetic Abeta1-42 monomers at 4 µM concentration, suggesting that NI-101.11 recognizes a conformational epitope that is not present in monomeric Abeta (Fig. 6).

[0302] To further assess binding of human recombinant NI-101.11 antibody to linear, monomeric synthetic Abeta, preparations of monomeric Abeta were separated by non-denaturing PAGE. Blotted protein was probed with human recombinant NI-101.11 antibody and a control antibody against N-terminal linear Abeta sequences (6E10). While 6E10 produced prominent staining of monomeric Abeta peptide, no binding was detected for human NI-101.11 suggesting that NI-101.11 does not bind to the linear monomeric Abeta peptide but recognizes a conformational Abeta epitope. (Fig. 7)

[0303] The binding of recombinant NI-101.11 to artificial amyloid fibrils prepared from synthetic Abeta1-42 peptides and monomeric Abeta was determined by ELISA (Fig. 8). Synthetic Abeta fibrils or monomeric synthetic Abeta coated onto ELISA plates at equal coating densities were incubated with NI-101.11 at the indicated concentrations. Binding to artificial amyloid fibrils (open squares) is more than 100 times higher as compared to monomeric Abeta (filled squares). Control antibody 22C4 against the C-terminus of Abeta preferentially binds to monomeric Abeta (filled circles), and less well to fibrils (open circles). This suggests that NI-101-10 recognizes a conformational epitope which is also present on artificial amyloid fibrils prepared from synthetic Abeta peptides.

[0304] Cross-reactivity of recombinant human NI-101.11 antibody against cellular full-length APP or with any of its physiological derivatives was determined by cell binding assays (Fig. 9).

[0305] Live HEK 293 cells stably expressing human APP fused to Citrin as a marker were incubated for 30 min at 4°C, to prevent internalization, with the recombinant human NI-101.11 antibody or the control antibody 6E10 against N-terminal linear Abeta sequence. Citrin-positive signals indicate APP-expressing cells. In contrast to the control antibody (6E10) that binds to cell-surface APP in all cells expressing the fusion construct, no binding of recombinant human NI-101.11 antibody to full-length APP is detected. These data demonstrate absent cross-reactivity of NI-101.11 to physiological, cellular APP.

[0306] The lack of binding of NI-101.11 to monomeric Abeta was further demonstrated by size exclusion chromatography: No binding of NI-101.11 or an unrelated control antibody was observed to monomeric FITC-labeled Abeta1-42 (Fig. 10A, 10B). In contrast, antibody 22C4 directed against a linear epitope present in the C-terminus of Abeta co-eluted with FITC-Abeta1-42 monomers (Fig. 10 C).

[0307] In a competition ELISA, binding of 6E10, an antibody directed against a linear epitope at the N-terminus of Abeta, could be completely blocked upon pre-incubation with excess concentrations of monomeric Abeta1-16, Abeta1-28 and Abeta1-40 peptides. In contrast, pre-incubation with excess concentrations of linear Abeta peptides did not abolish NI-101.11 binding, suggesting that NI-101.11 requires a conformational epitope (Fig. 11).

NI-101.13A and 13B

[0308] Recombinant human antibodies NI-101.13A and 13B were tested for binding to brain sections obtained from an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease (Tg2576). NI-101.13A and NI-101.13B produced prominent staining of beta-amyloid plaques at 10 nM concentration (Fig. 12). The binding of recombinant NI-101.13A and NI-101.13B to artificial amyloid fibrils prepared from synthetic Abeta1-42 peptides and monomeric Abeta was determined by ELISA. Synthetic Abeta fibrils or monomeric synthetic Abeta coated onto ELISA plates at equal coating densities were incubated with NI-101.13A and NI-101.13B at the indicated concentrations. Preferential binding to artificial amyloid fibrils as compared to monomeric Abeta was observed for both antibodies tested. (Fig. 13)

NI-101.12

[0309] The binding of recombinant NI-101.12 to synthetic Abeta1-42 peptide was confirmed by ELISA (Fig. 14A). NI-101.12 binding at 133nM concentration was competed by excess of Abeta1-42 peptide (Fig 14 B).

Example 3

Recombinant Human Antibody against Brain Beta-Amyloid Crosses the Blood Brain Barrier in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease, and Binds to Brain Beta-Amyloid Plaques *In vivo*

[0310] To determine whether recombinant human NI-101.11 antibody crosses the blood brain barrier and binds to brain beta-amyloid plaques *in vivo* transgenic PS-1/APPswe Alzheimer's disease model mice received two peripheral injections of 150µg NI-101.11 at day 1 and day 3. Mice were sacrificed 24 h after the second injection and perfused with PBS. Brains were harvested and brain sections were stained with FITC-labeled antibodies against human IgG or with the mouse monoclonal Abeta antibody 6E10 followed by a FITC-labeled antibody against mouse IgG to confirm the presence of brain beta-amyloid plaques. Intense staining of amyloid plaques with anti-human IgG indicated that the

recombinant human NI-101.11 antibody can cross the blood-brain barrier of transgenic mice and bind to brain beta-amyloid plaques in living animals (Fig. 15).

Example 4

Recombinant Human Antibody against Beta-Amyloid Improves Abnormal Cognitive Behavior and Confers Reduction of Beta-Amyloid Plaque Load, Astrogliosis and Microgliosis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease without Increasing the Frequency of Microhemorrhages

[0311] 24 months old arcAbeta mice and age-matched wild type littermates were treated weekly i.p. with 3 mg/kg recombinant human NI-101.11 antibody or an isotype-matched human control antibody for 2 months. To assess the treatment effect on abnormal behavior in the transgenic mice, Y-maze behavioral testing was performed before and after completion of the treatment. The spontaneous rate of alternation was assessed using a Y-shaped plastic maze, with 40 x 20 x 10 cm arm sizes. During 5 min sessions, the sequences of arm entries were recorded; alternation was defined as successive entries into the three arms, in overlapping triplet sets. The percent alternation was calculated as the ratio of actual to possible alternations (defined as the total number of arm entries – 2) multiplied by 100%. The Y-maze performance of untreated arcAbeta mice and wildtype littermate controls was compared using an unpaired t-test. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare the improvement after treatment in all 4 groups. The nonparametric Mann-Whitney U test was chosen for pair-wise comparison of the different groups. Zero-performers (i.e. mice that did not leave the arm they were placed in) were excluded from the analysis.

[0312] As was observerd in previous studies, untreated 24-months old arcAbeta mice were significantly impaired compared to their wildtype littermates (Fig. 16A , before treatment; unpaired t-test, p=0.0007).

[0313] NI-101.11 treated arcAbeta mice showed clearly enhanced alteration levels, comparable to NI-101.11 treated wildtype control mice after the 2 months treatment. Analysis of the improvement (i.e. performance after treatment minus performance before treatment) showed a significant difference between the four groups (Fig. 16 B, Kruskal-Wallis test; p=0.03). A pair-wise post-hoc analysis between all groups showed that NI-101.11 treated arcAbeta mice improved their cognitive performance significantly more than wildtype mice (Mann-Whitney U; p=0.05 NI-101.11 tg vs. NI-101.11 wt; p=0.008 NI-101.11 tg vs. control wt). This group of mice also showed a strong trend towards improved performance compared to the control antibody treated transgenic littermates (Mann-Whitney-U; p=0.08 NI-101.11 tg vs. control tg). All mice showed a ~10% improvement in performance in the re-testing, which was likely due to the familiar environment of the task.

[0314] The effects of chronic, 2 months NI-101.11 treatment on amyloid burden, astrogliosis and microgliosis were analyzed by quantitative histochemical and immunohistochemical analysis. To that end, mice were anesthetized after completion of the behavioral testing and perfused transcardially with PBS. One brain hemisphere was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 5 µm sagittal sections were cut with a Leica RM 2135 microtome (Bannockburn, Illinois). Beta-amyloid plaque load in cortex and hippocampus was quantified on brain sections stained with Thioflavin S and Congo Red according to standard protocol. For immunohistochemistry, slices were dewaxed, blocked with 4% BSA, 5% goat serum and 5% horse serum in PBS for 1h at RT. Antibodies were incubated overnight at 4°C using the following dilutions: anti GFAP (Advanced Immunochemicals) 1: 500, anti IBA1 (WAKO) 1:500. 2nd fluorophore coupled antibodies were incubated at RT for 2h. 2-3 sections per mouse brain spaced 75 µm apart were used for each staining. 2 images per section were taken at 10x magnification for cortex analysis (parietal and frontal region). The entire hippocampus area (5x magnification cropped to ROI) was taken for the hippocampus analysis. Automated image analysis was done with the software ImageJ.

[0315] Double staining of brain sections from immunized arcAbeta mice with 6E10 and anti-human IgG revealed binding of NI-101.11 to Abeta deposits (Fig. 17, left panel), indicating that NI-101.11 can cross the blood brain barrier and bind to brain beta-amyloid plaques. No such binding of human antibody to Abeta deposits was seen in control antibody treated arcAbeta mice (Fig. 17 right panel).

[0316] [0317] Chronic treatment with with 3mg/kg of NI-101.11 resulted in a significant reduction of amyloid plaque load as was revealed by Thioflavin S and Congo Red staining. This reduction reached levels of greater than 50% in cortex and hippocampus compared to control antibody-treated arcAbeta mice (Fig. 18 A, B). In addition to the plaque area (Fig 18 C), significant reductions were also observed for the number of plaques (Fig. 18 D) and the average plaque size (Fig. 18 E).

[0317] To test whether chronic treatment with NI-101.11 affects the neuroinflammatory response in arcAbeta mice, reactive astrocytes and microglia were quantified after immunohistological staining. A reduction in the number of reactive astrocytes (anti GFAP-staining) was observed in the cortex of NI-101.11 treated arcAbeta mice compared to control antibody treated animals (Fig. 19A; Mann-Whitney-U; p=0.047). No change was detected in the hippocampus. Staining with an antibody against a marker of microglia and macrophages (anti-Iba1) also revealed a statistical trend towards reduced inflammation (Fig. 19 B; Mann-Whitney-U; p=0.075 for both cortex and hippocampus). The decrease in astrocytosis and microgliosis is in line with the reduced beta-amyloid load observed after NI-101.11 treatment

[0318] Passive immunotherapy with certain monoclonal antibodies directed against Abeta can be associated with increased frequency of microhemorrhages in the brain (Pfeifer et al., Science 298 (2002), 1379; Wilcock et al., J Neuroinflammation 1 (2004), 24). To assess the effects of chronic therapy with NI-101.11, Perl's Prussian blue staining was performed on brain sections from arcAbeta and wild-type mice after chronic NI-101.11 treatment. This staining reveals the presence of hemosiderin, a breakdown product of hemoglobin, and marker of previous microhemorrages (Fig. 20). In aged arcAbeta mice treated with a control antibody, the frequency of Prussian blue positive profiles was significantly elevated compared to wild-type littermates (Mann-Whitney-U; p=0.001). Treatment with the NI-101.11 did not lead to an increase the number of microhemorraghes when compared to control-antibody treated arcAbeta mice (Mann-Whitney-U; p=0.347) indicating that the beneficial therapeutic effects of NI-101.11 treatment occurred in the absence of this frequently observed side effect of passive Abeta immunotherapy.

Example 5

Recombinant Human Antibody against Brain Beta-Amyloid Inhibits the Formation of Synthetic Abeta Fibrils *In vitro*

[0319] The effect of recombinant human NI-101.11 antibody on the formation of Abeta-fibrils was assayed by measuring Thioflavin S bound to aggregated Abeta by fluorescence analysis. Monomeric Abeta solutions were incubated at 37°C for 24 h in the presence of absence of increasing concentration of NI-101.11. The formation of synthetic Abeta fibrils *in vitro* was inhibited by recombinant human NI-101.11 in a concentration dependent manner (Fig. 21).

Example 6

NI-101.11 Effects on Ex-vivo Phagocytosis of Abeta Fibrils by BV-2 Microglial-derived Cells

[0320] The effects of NI-101.11 on Fcgamma-receptor mediated phagocytosis of Abeta fibrils were studied in the BV-2 microglial-derived cell line. BV-2 cells were maintained in DMEM supplemented with 5% FBS, , Pen/Step and glutamine. Cells were trypsinized and 120'000 BV-2 cells/well were seeded in flat bottom 24-well plates. After 12 h, the medium was replaced with 400 ul DMEM/F12/well supplemented with 20mM HEPES (pH 7.3), 1% BSA, 10 µg/ml Pen/Step . 100 µg/ml Fucoidan, an inhibitor of the scavenger receptor, was added 30 min prior to experiment. 50 µM FITC-labeled Abeta fibrils were pre-incubated with the indicated concentrations of antibodies for 30 min at 37°C, washed twice followed by centrifugation for 5 min at 14'000 x g. This suspension was added to the tissue culture plates. After 30 min BV-2 cells were washed twice with HBSS to remove unassociated fibrillar Abeta.

[0321] Cells were treated with 250 µg/ml trypsin/EDTA for 20 min at 4°C and washed twice by centrifugation at 500 x g for 5 min at 4°C. Cells were fixed for 20 min in FACS-Fix (PBS, 2%FA, 2% Glucose, 5 mM NaN) and washed twice with FACS wash (PBS, 5 µM EDTA, 0.2% BSA). Fluorescence (FL-1) of 10'000 cells was determined by FACS analysis (based on Webster SD et al, JI 2001).

[0322] Fcgamma receptor-dependent phagocytosis of FITC-labeled Abeta1-42 fibrils was measured upon inhibition of the scavenger receptor system. Comparative analysis of human NI-101.11 and a commercially available antibody directed to a linear epitope at the N-terminus of the Abeta peptide (6E10) demonstrated dose-dependent induction of phagocytosis of Abeta fibrils. The uptake of fibrils mediated by NI-101.11 is up to 3 fold higher than that observed for the 6E10 antibody (Fig. 22). These data indicate that NI-101.11 triggers potent dose-dependent Fcgamma receptor-mediated phagocytosis of Abeta fibrils by microglial cells.

Conclusion

[0323] As demonstrated in the above experiments performed in accordance with the present invention it was surprisingly possible to detect protective and therapeutically active antibodies and antibody producing B-cells in phenotypically healthy, asymptomatic human subjects, as well as in patients with unusually stable clinical disease courses despite a diagnosis of cognitive impairment or Alzheimer's disease. More specifically, a new class of human antibodies could be detected and isolated, which discriminate the physiologically functional form of an antigen, thereby minimizing the risk of autoimmunogenic side effects hitherto being a problem in immunotherapy. Thus, antibodies and equivalent binding molecules are provided that specifically recognize a variant of the antigen in a pathophysiologically relevant structure, which the antibody is supposed to bind in order to diminish its toxicity or to reduce its concentration or to promote its degradation, by means of, for example, making the pathogen for FcR-expressing macrophages or microglia cells visible and therefore to render it innocuous. As further demonstrated in the examples such antibodies are therapeutically effective and are capable of both suspending as well as preventing deleterious effects of abnormal pathological proteins and aggregates thereof without increasing the frequency of brain microhemorrhages.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of isolating a disorder-associated protein specific binding molecule comprising:
   (a) subjecting a sample obtained from a patient who is symptom-free but affected with or at risk of developing a disorder, or a patient with an unusually stable disease course to a specimen of pathologically altered cells or tissue of predetermined clinical characteristics; and
   (b) identifying and optionally isolating a binding molecule which binds to said specimen but not to corresponding cells or tissues of a healthy subject.

2. The method of claim 1, wherein said sample comprises a body fluid or a cell sample.

3. The method of claim 2, wherein said body fluid is a cerebrospinal fluid, plasma or 5 urine.

4. The method of any one of claims 1 to 3, wherein said binding molecule is an antibody.

5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein said sample comprises or is derived from B-cells or memory B-cells.

6. The method of any one of claims 1 to 5, wherein said patient and subject, respectively, is a human.

7. The method of any one of claims 1 to 6, wherein said patient has been determined to be affected with a not yet manifested disorder or at risk to develop the disorder by the presence or absence of a surrogate marker.

8. The method of claim 7, wherein said surrogate marker is selected from the group consisting of old age, brain amyloid load, ApoE genotype, APP genotype, PS1 genotype, levels in body fluids of Abeta peptide, isoprostanes, Tau, and phospho-Tau.

9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein said disorder is selected from the group consisting of neurological disorders, autoimmune disorders and tumors.

10. The method of any one of claims 1 to 9, wherein said disorder is Alzheimer's disease.

11. The method of claim 10, wherein the sample is obtained from a patient fulfilling the following criteria:

(i) being 65 years of age or older;

(ii) having full cognitive capacity and good health; and

(iii) having no clinical signs of dementia; or

(iv) having unusually slow rates of progression of disease despite the presence of an established clinical diagnosis of probable Alzheimer's disease.

12. The method of any one of claims 1 to 11 further comprising the steps of:

(i) purifying B cells or B memory cells from a sample which has been identified to contain binding molecules, *e.g.* antibodies which bind to said specimen but not to corresponding cells or tissue of a healthy subject;

(ii) obtaining the immunoglobulin gene repertoire for said antibodies from said B cells or B memory cells; and

(iii) using said repertoire to express said antibodies.

13. The method of claim 12, wherein step (ii) comprises the steps of

(iv) obtaining mRNA from said B cells or memory B cells;

(v) obtaining cDNA from the mRNA of step (iv); and

(vi) using a primer extension reaction to amplify from said cDNA the fragments corresponding to the heavy chains (HC) and the kappa light chains (LC) of said antibodies.

14. A binding molecule obtainable by the method of any one of claims 1 to 13, which is capable of selectively recognizing a neoepitope of a disorder-associated protein.

15. The binding molecule of claim 14, which does not substantially recognize said protein in its non-disorder-associated form.

16. The binding molecule of claim 14 or 15, which is an antibody or an antigen binding fragment thereof.

17. The antibody of claim 16, which is a human antibody.

18. The binding molecule of any one of claims 14 to 17, wherein said disorder is a neurological disorder.

19. The binding molecule of any one of claims 14 to 18, wherein said disorder is a disorder of the brain.

20. The binding molecule of any one of claims 14 to 19, which is capable of crossing the blood brain barrier at the site of the pathological event.

21. The binding molecule of any one of claims 14 to 20, capable of binding beta-amyloid plaques, cerebrovascular amyloid, diffuse Abeta deposits, neurofibrillary tangles, hyperphosphorylated tau, alpha-synuclein positive Lewy-bodies or protein aggregates associated with dystrophic neurites.

22. The binding molecule of any of claims 14 to 21, which is capable of substantially restoring normal behavior.

23. The binding molecule of any one claims 14 to 22, which is selected from the group consisting of a single chain Fv fragment (scFv), a F(ab') fragment, a F(ab) fragment, and an F(ab')$_2$ fragment.

24. The binding molecule of any one claims 14 to 23, which is an antibody or binding fragment thereof comprising in its variable region at least one complementarity determining region (CDR) as depicted in Table 4.

25. The antibody or binding fragment of claim 24 comprising an amino acid sequence of the V_H and/or V_L region as depicted in Tables 2 and 3.

26. An antigen which is recognized by the binding molecule of any one of claims 14 to 25.

27. The antigen of claim 26, which is at least part of a disorder-associated protein as defined in any one of the preceding claims.

28. A polynucleotide encoding the binding molecule of any one of claims 14 to 25 or the antigen of claim 26 or 27.

29. The polynucleotide of claim 28 encoding at least the variable region of an immunoglobulin chain of the antibody or binding fragment of claim 24 or 25.

30. A vector comprising the polynucleotide of claim 28 or the polynucleotide of claim 29, optionally in combination with a polynucleotide of claim 29 that encodes the variable region of the other immunoglobulin chain of said antibody.

31. A host cell comprising a polynucleotide of claim 28 or 29 or a vector of claim 30.

32. A method for preparing a disorder-associated protein specific binding molecule, an antibody or a binding fragment or immunoglobulin chain(s) thereof, said method comprising

(a) culturing the cell of claim 31; and

(b) isolating said binding molecule, antibody or binding fragment or immunoglobulin chain(s) thereof from the culture.

33. A binding molecule, an antibody, an immunoglobulin chain or a binding fragment thereof encoded by a polynucleotide of claim 28 or 29 or obtainable by the method of claim 32.

34. The binding molecule, antibody or binding fragment of any one of claims 14 to 25 or 33, which is detectably labeled.

35. The binding molecule, antibody or binding fragment of claim 34, wherein the detectable label is selected from the group consisting of an enzyme, a radioisotope, a fluorophore and a heavy metal.

36. The binding molecule, antibody or binding fragment of any one of claims 14 to 25 or 33 to 35, which is attached to a drug.

37. A composition comprising the binding molecule, antibody or binding fragment of any one of claims 14 to 25 or 33 to 36, the antigen of claim 26 or 27, the polynucleotide of claim 28 or 29, the vector of claim 30 or the cell of claim 31.

38. The composition of claim 37, which is a pharmaceutical composition and further comprises a pharmaceutically acceptable carrier.

39. The pharmaceutical composition of claim 38 further comprising an additional agent useful for treating Alzheimer's disease, selected from the group consisting of small organic molecules, anti-Abeta antibodies, and combinations thereof.

40. The composition of claim 37, which is a diagnostic composition and further comprises reagents conventionally used in immuno or nucleic acid based diagnostic methods.

41. Use of the binding molecule, antibody or binding fragment of any one of claims 14 to 25 or 33 to 36 or of an antibody having substantially the same binding specificities of any one thereof, the antigen of claim 26 or 27, the polynucleotide of claim 28 or 29, the vector of claim 30 or the cell of claim 31 for the preparation of a pharmaceutical or diagnostic composition for treating or preventing the progression of Alzheimer's disease; for the amelioration of symptoms associated with Alzheimer's disease; for diagnosing or screening a subject for the presence of Alzheimer's disease or for determining a subject's risk for developing Alzheimer's disease.

42. The use of claim 41, wherein said pharmaceutical composition is administered intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally, intranasally, parenterally or as an aerosol.

43. A method of treating a neurological disorder characterized by abnormal accumulation and/or deposition of a protein in the central nervous system, which method comprises administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of the binding molecule of any one of claims 14 to 25 or 33 to 36, the antigen of claim 26 or 27, the polynucleotide of claim 28 or 29, the vector of claim 30 or the cell of claim 31.

44. The method of claim 43, wherein said disorder is selected from the group consisting of Alzheimer's disease, Down's syndrome, mild cognitive impairment, cerebral amyloid angiopathy, vascular dementia, multi-infarct dementia, Parkinson's disease, Huntington's disease, Creutzfeldt-Jakob disease, cystic fibrosis, or Gaucher's disease.

45. The method of claim 43 or 44, wherein administration is performed intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally, intranasally, parenterally or as an aerosol.

46. A method of diagnosing and/or treating a disorder related to Alzheimer's disease and Abeta deposition, respectively, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a ligand Abeta-binding molecule comprising at least one CDR of the antibody or binding fragment of claim 24 or 25 or a corresponding anti-idiotypic antibody.

47. A kit for the diagnosis of a disorder which is accompanied with the presence of a disorder-associated protein as defined in any one of the peptides claimed, said kit comprising the binding molecule, antibody or binding fragment of any one of claims 14 to 25 or 33 to 36, the antigen of claim 26 or 27, the polynucleotide of claim 28 or 29, the vector of claim 30 or the cell of claim 31, optionally with reagents and/or instructions for use.

48. Use of a binding molecule, an antibody or binding fragment thereof of any one of claims 14 to 25 or 33 to 36 for *in vivo* detection of or targeting a therapeutic and/or diagnostic agent to a disorder-associated protein in the brain, detecting, suppressing formation of or reducing pathological protein aggregates or conformations in a subject, for improving cognition or slowing or reversing cognitive decline associated with diseases, or for extra-corporal extraction of pathological compounds or their precursors from body fluids.

49. An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof which specifically binds to the same neoepitope of a disorder-associated protein as a reference antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B.

50. An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof, wherein the antibody competitively inhibits a reference antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B from binding to the neoepitope of a disorder-associated.

51. An isolated antibody or antigen-binding fragment thereof wherein the antibody comprises an antigen binding domain identical to that of an antibody selected from the group consisting of NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, and NI-101.13B.

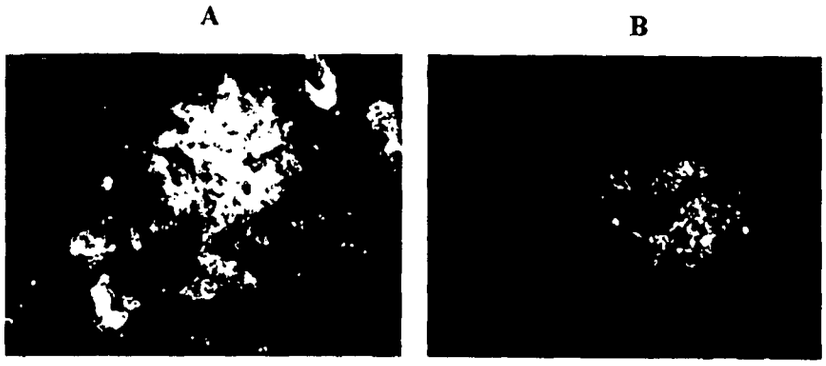


FIG. 1

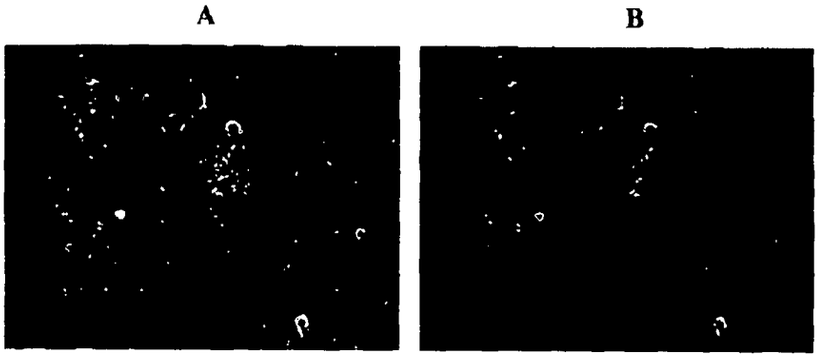


FIG. 2

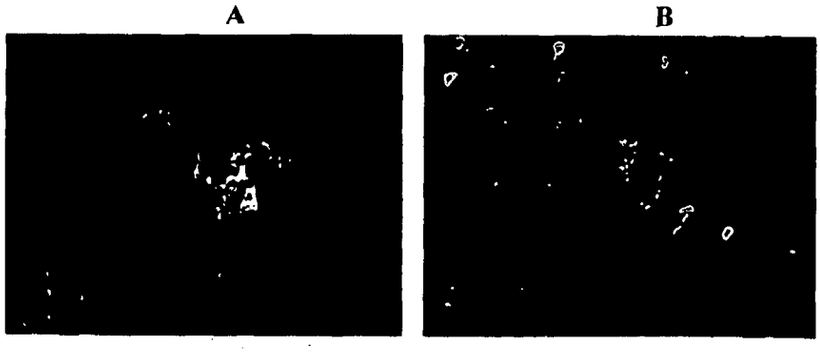


FIG. 3

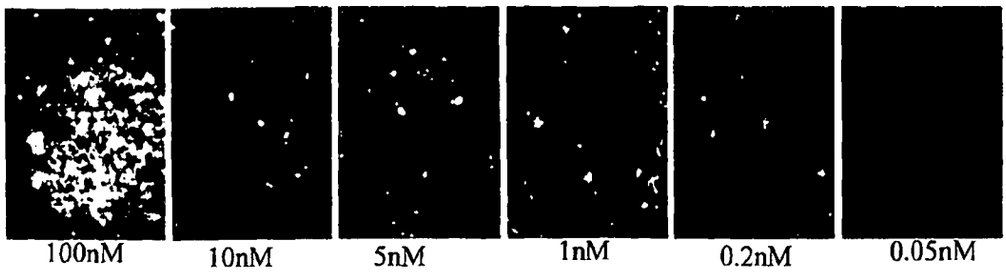


FIG. 4

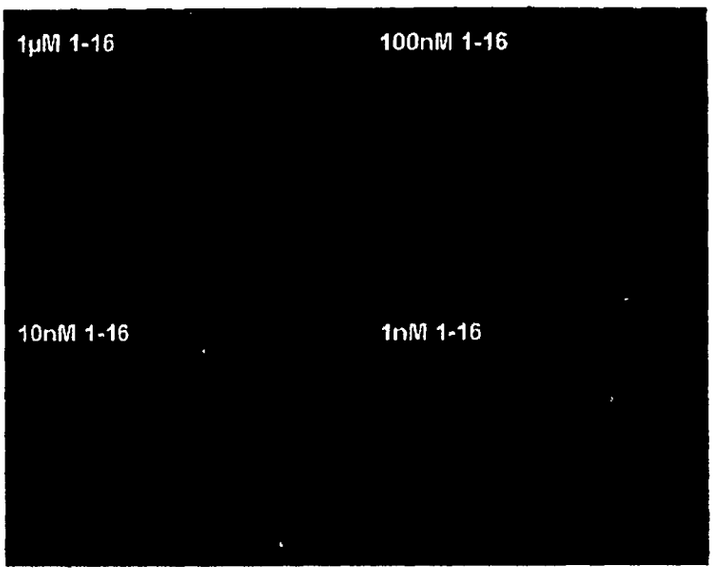


FIG. 5

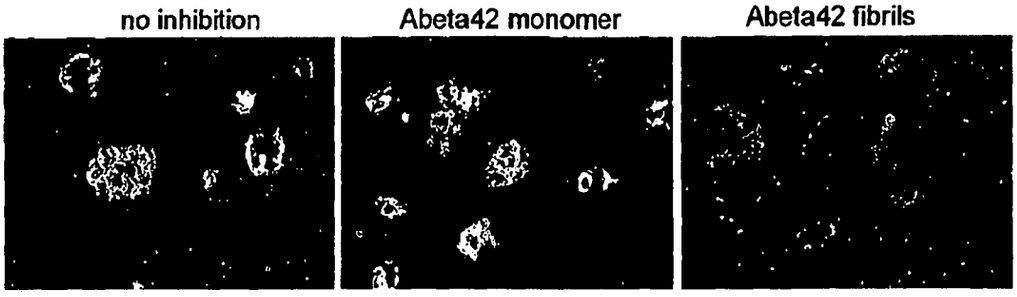


FIG. 6

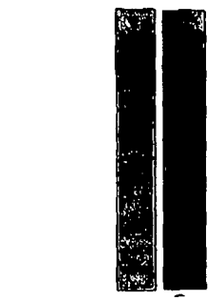


FIG. 7

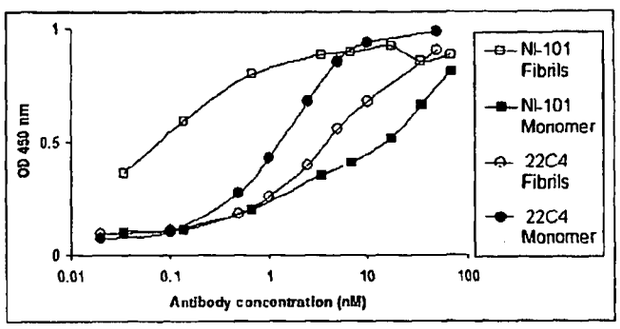


FIG. 8

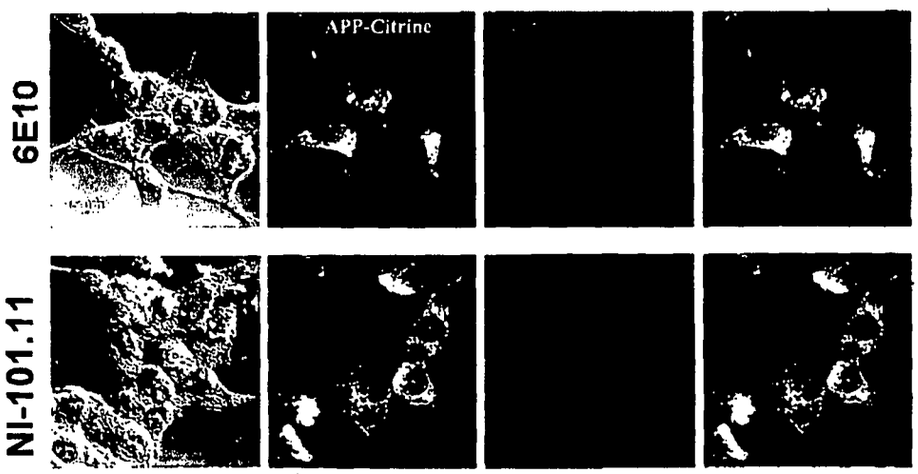


FIG. 9

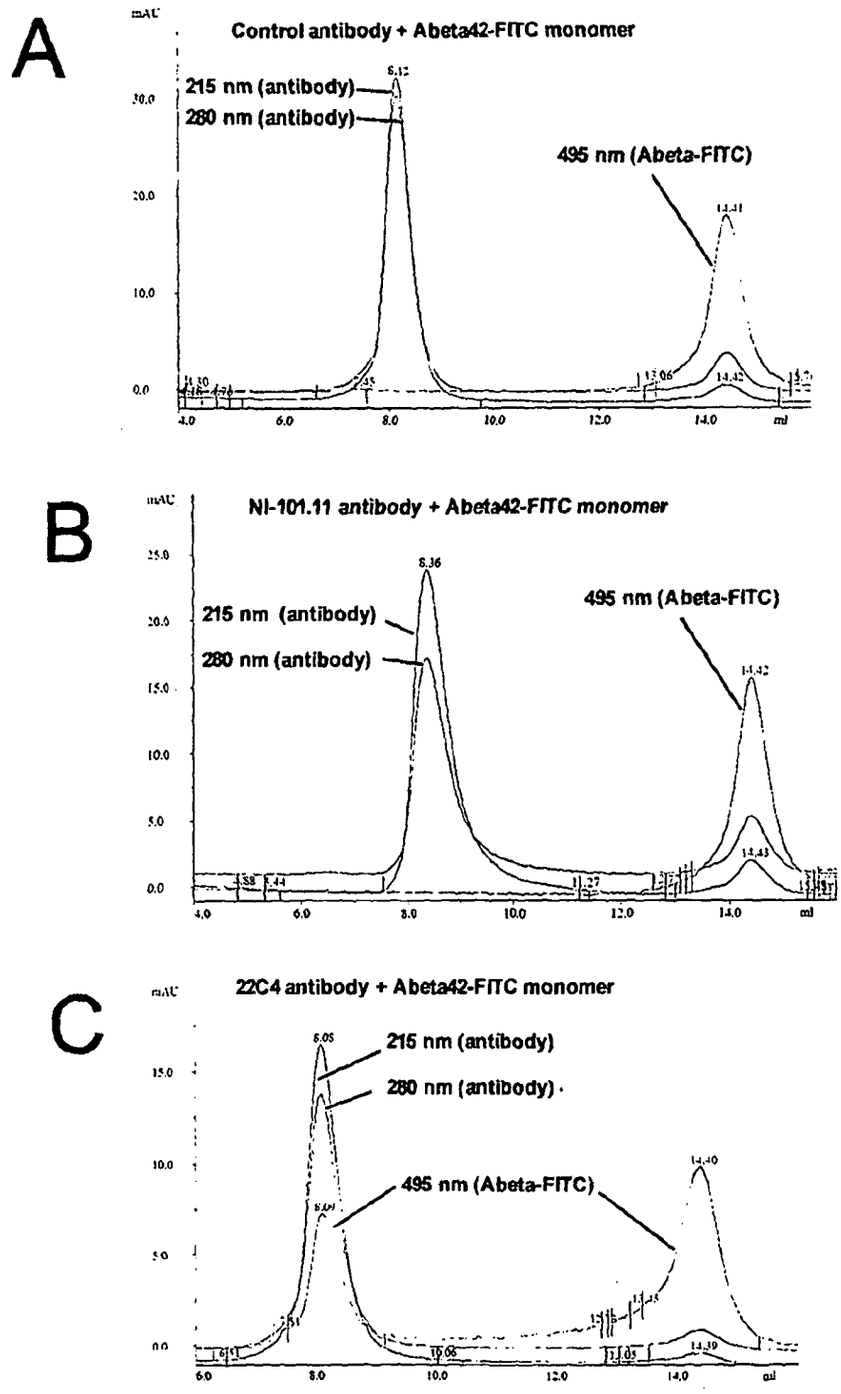

A
Control antibody + Abeta42-FITC monomer
215 nm (antibody)
280 nm (antibody)
495 nm (Abeta-FITC)
B
NI-101.11 antibody + Abeta42-FITC monomer
215 nm (antibody)
280 nm (antibody)
495 nm (Abeta-FITC)
C
22C4 antibody + Abeta42-FITC monomer
215 nm (antibody)
280 nm (antibody)
495 nm (Abeta-FITC)

FIG. 10A-C

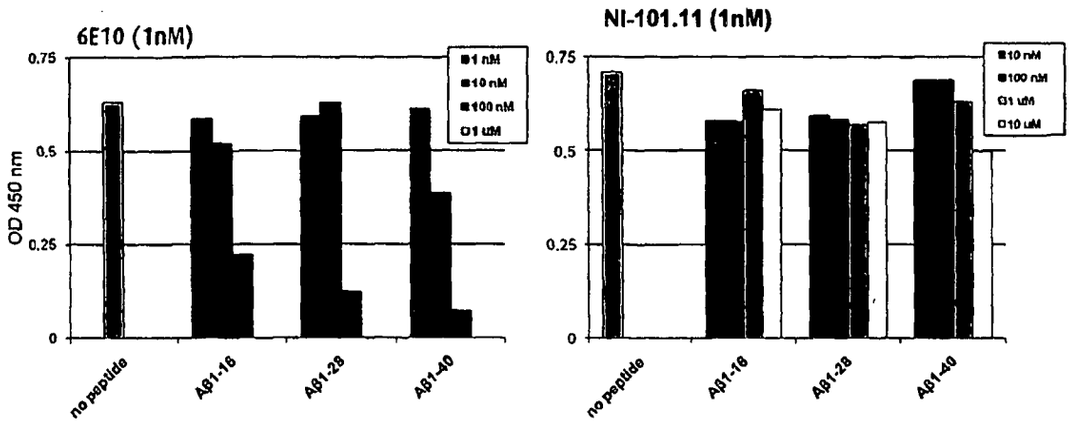


FIG. 11

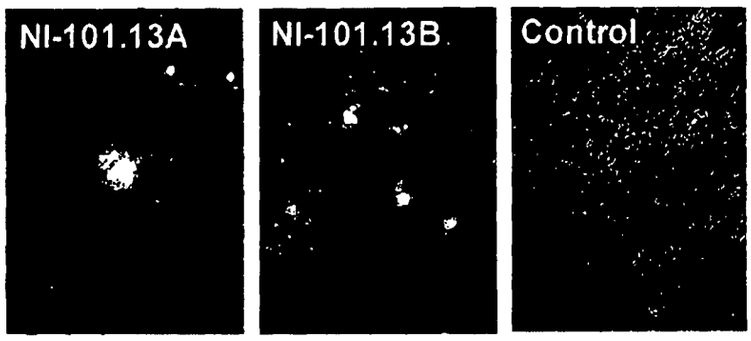


FIG. 12

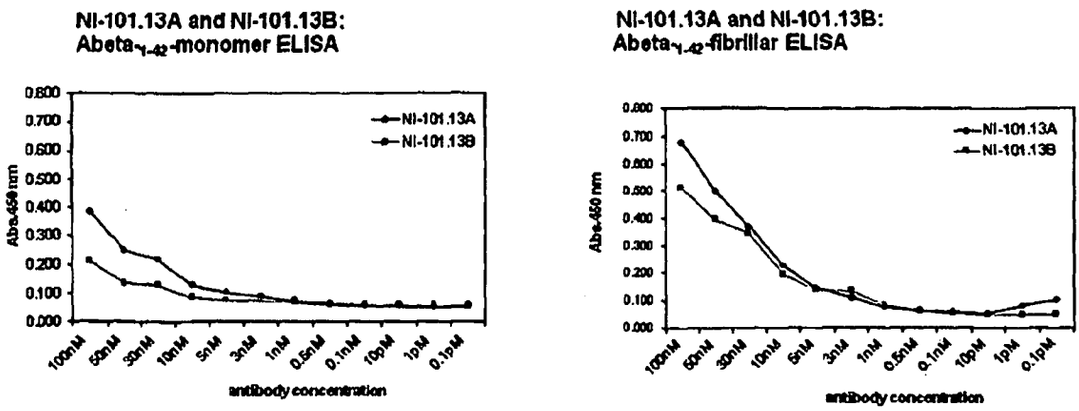


FIG. 13

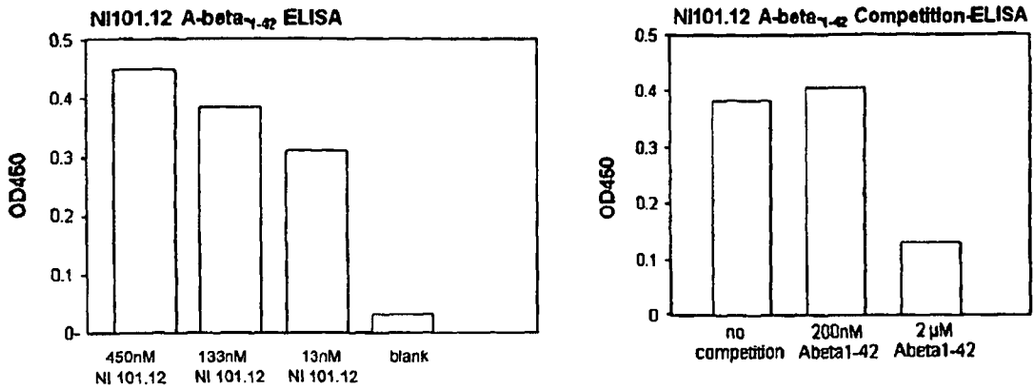


FIG. 14A-B

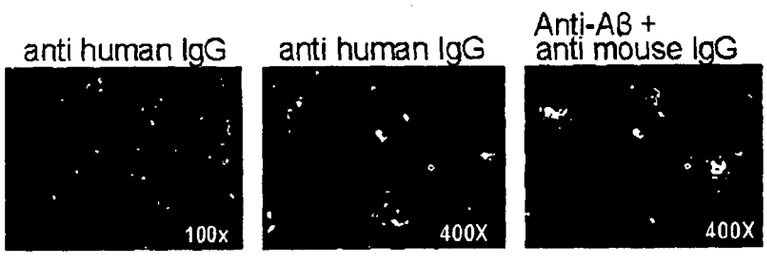


FIG. 15

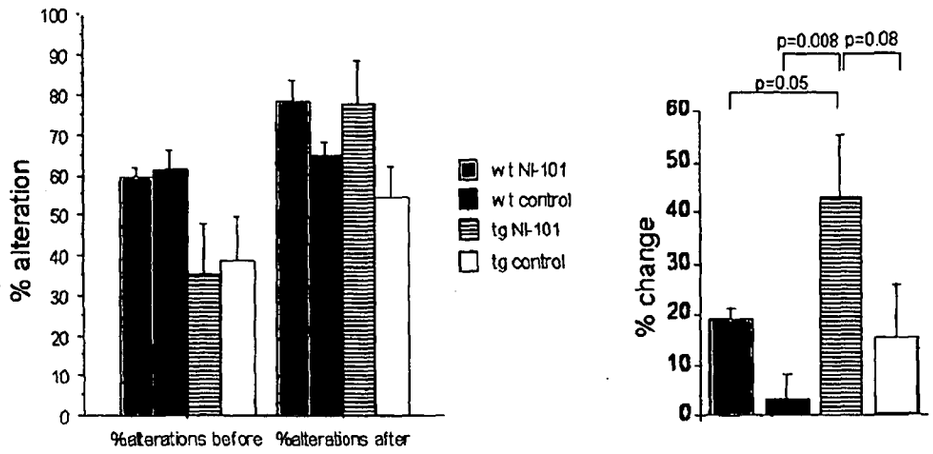


FIG. 16A-B

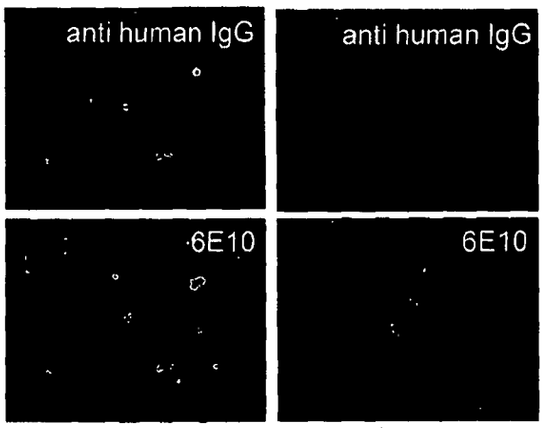


FIG. 17

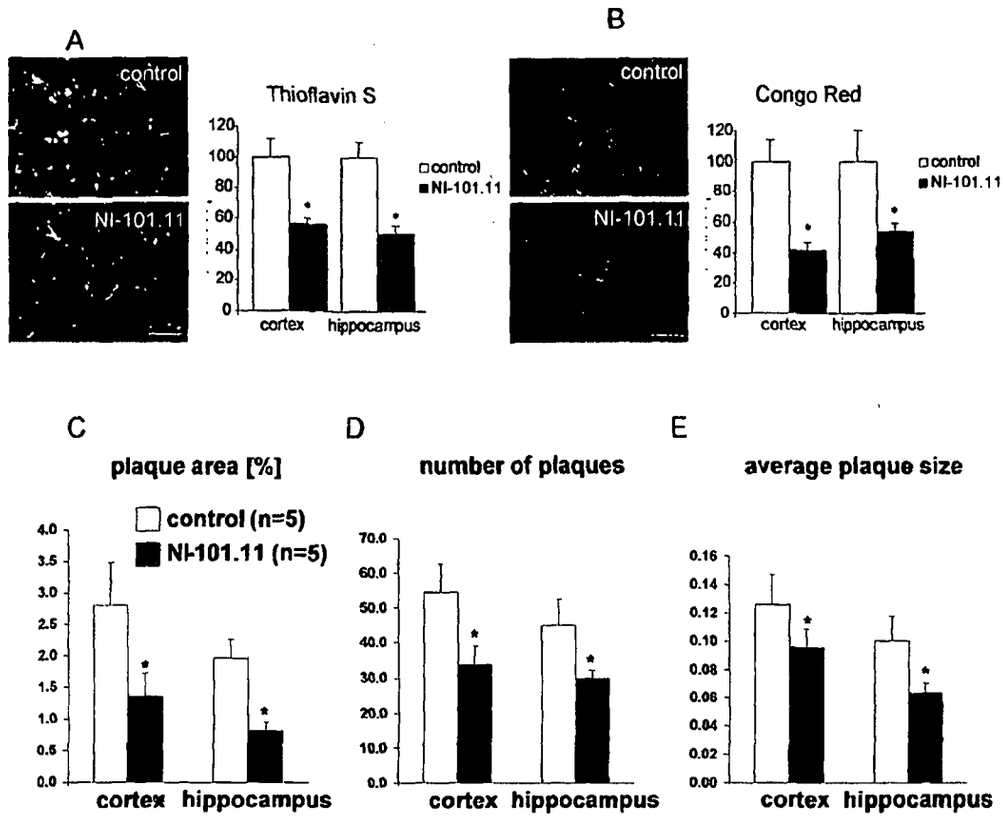


FIG. 18A-E

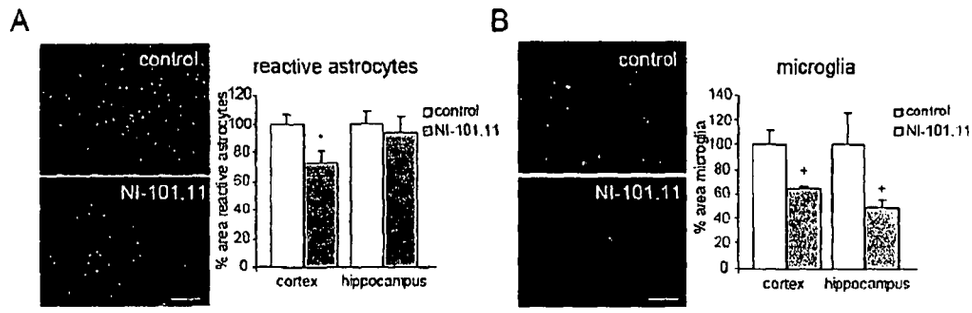


FIG. 19A-B

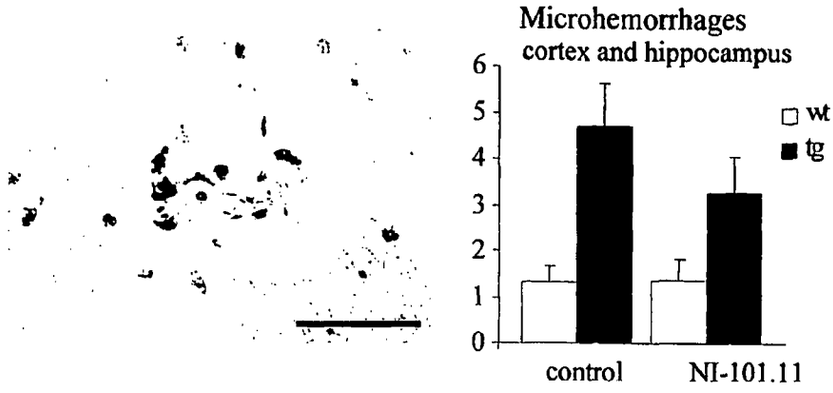

Microhemorrhages
cortex and hippocampus
6
5
4
3
2
1
0
wt
tg
control
NI-101.11

FIG. 20

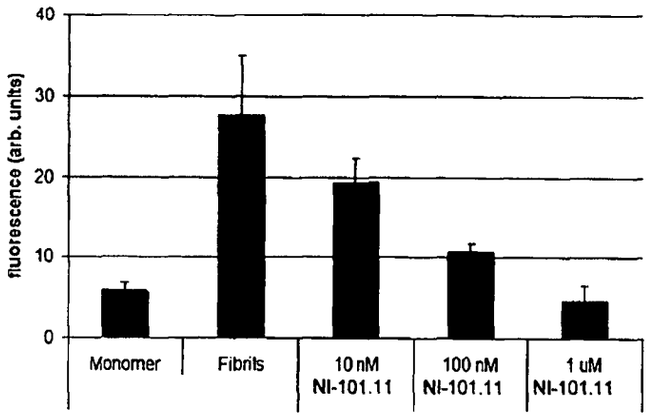

fluorescence (arb. units)
40
30
20
10
0
Monomer
Fibrils
10 nM NI-101.11
100 nM NI-101.11
1 uM NI-101.11

FIG. 21

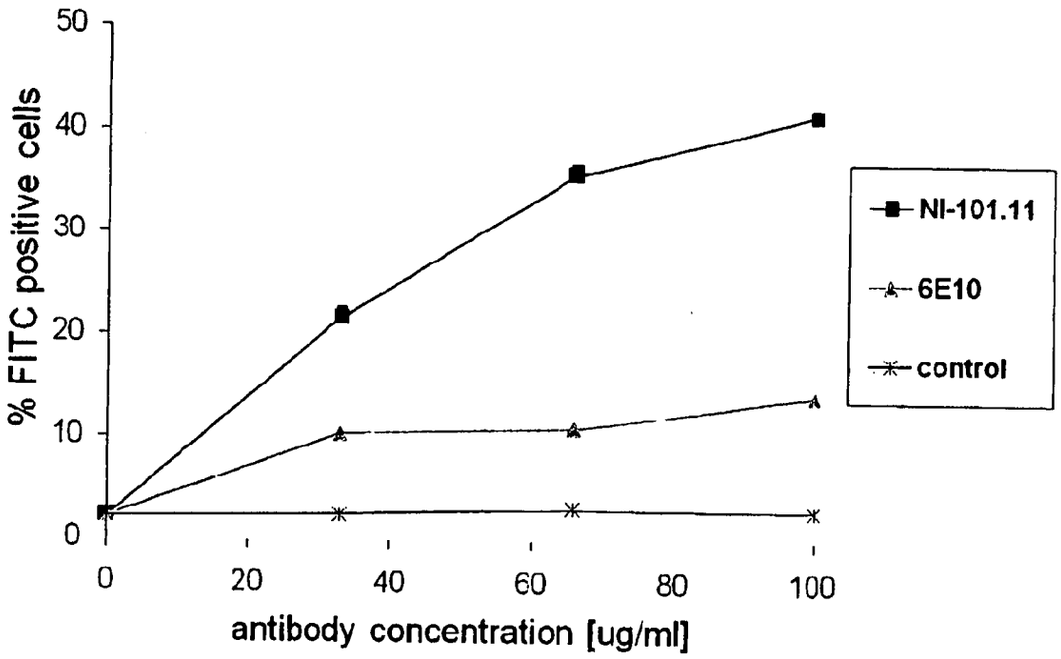

50
40
30
20
10
0
% FITC positive cells
0
20
40
60
80
100
antibody concentration [ug/ml]
NI-101.11
6E10
control

FIG. 22

SEQUENCE LISTING

<110> University of Zurich

<120> Method of providing disease-specific binding molecules and targets

<130> NE30A06/P-WO

<160> 56

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 66
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(66)
<223> Leader peptide derived from human Vkappa I L5, restriction site Xba 1 introduced 3' of the sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(66)

<400> 1
atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg 48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ttc ccc ggc tct aga tgc 66
Phe Pro Gly Ser Arg Cys
20

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys
20

<210> 3
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(372)
<223> NI-101.10-variable heavy (Vh) chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 3

```
gag gtg cag cta gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg       48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110
```

```
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  5
<211>  372
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Codon optimized


<220>
<221>  V_region
<222>  (1)..(372)
<223>  NI-101.11-variable heavy (Vh) chain sequence

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(372)

<400>  5
gag gtg cag ctg gtg cag agc ggc ggc ggc gtg gtg cag ccc ggc cgg       48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

agc ctg cgg ctg agc tgc gcc gcc agc ggc ttc gcc ttc agc agc tac       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc atg cac tgg gtg cgg cag gcc ccc ggc aag ggc ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gcc gtg atc tgg ttc gac ggc acc aag aag tac tac acc gac agc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac acc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc cgg gac cgg ggc atc ggc gcc cgg cgg ggc ccc tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtg tgg ggc aag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  6
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  6

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15


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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 7
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(327)
<223> NI-101.10 and NI-101-11-variable kappa (Vkappa) light chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 7

```
gaa att gtg ctg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
                85                  90                  95

act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg                  327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

<210> 9
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(381)
<223> NI-101.12-variable heavy (Vh) chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 9

```
gag gtg cag ctg gtg gag agc ggc ccc ggc ctg gtg aag ccc gcc gag       48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1               5                  10                  15

acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg agc ggc ggc agc atc cgg agc ggc       96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
            20                  25                  30

agc atc tgc tgg tac tgg atc cgg cag ccc ccc ggc aag ggc ctg gag      144
Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg atc ggc tac ttc tgc tac agc ggc gcc acc ttc tac acc ccc agc      192
Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
    50                  55                  60
```

```
ctg cgg ggc cgg ctg acc atc agc gtg gac gcc agc aag aac cag ctg      240
Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
65                  70                  75                  80

agc ctg agc ctg agc agc gtg acc gcc gcc gac acc gcc gtg tac tac      288
Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

tgc gcc cgg cgg gcc ggc gag aac agc ggc ggc atc gag ccc tac tac      336
Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
            100                 105                 110

ggc atg gac gtg tgg ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc          381
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 10
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
            20                  25                  30

Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
            100                 105                 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 11
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(330)
<223> NI-101.12-variable kappa (Vkappa) light chain sequence

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 11

```
gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc       48
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1               5                   10                  15

ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag       96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
            20                  25                  30

tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg      144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc ggc gcc ccc agc cgg gtg agc      192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
    50                  55                  60

ggc agc ggc ttc ggc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc ggc ctg cag      240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

gcc gag gac ttc ggc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc      288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
                85                  90                  95

tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc              330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110
```

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

```
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1               5                   10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
            20                  25                  30

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
    50                  55                  60

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110
```

<210> 13
<211> 363

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(363)
<223> NI-101.13-variable heavy (Vh) chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 13

```
cag gta cag ctg cag gag tca ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag        48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga aga        96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
            20                  25                  30

agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag       144
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg agt gga agt atc cat tat agc ggg agc acc tac tac aac ccg tcc       192
Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

ctc aag agt cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc       240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

tcc ctg aaa ctg agc tct gtt acc gcc gca gac acg gct gtc tat tac       288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

tgt gcg aga tca cgt tgg ggc agc agc tgg gta ttt gac tac tgg ggc       336
Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

cag ggc aca ctg gtc acc gtc tct tcg                                  363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
            20                  25                  30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60
```

```
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 15
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(330)
<223> NI-101.13-variable lambda (Vlambda) light chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<400> 15

```
cag agc gtg ctg acc cag ccg ccg agc gcg agc ggc acc ccg ggc cag       48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac       96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
            20                  25                  30

tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg      144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc      192
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc      240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg      288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
                85                  90                  95

agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg              330
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 16
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1               5                  10                  15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
            20                  25                  30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10 Vh, CDR1

<400> 17

```
Ser Tyr Gly Ile His
1               5
```

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

```
Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1               5                  10                  15
```

Gly

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10 Vh, CDR3

<400> 19

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.11 and NI-101.12F6A Vh, CDR1

<400> 20

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.11 and NI-101.12F6A Vh, CDR2

<400> 21

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.11and NI-101.12F6A Vh, CDR3

<400> 22

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10, NI-101.11 and NI-101.12F6A Vkappa, CDR1

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10, NI-101.11 and NI-101.12F6A Vkappa, CDR2

<400> 24

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.10, NI-101.11 and NI-101.12F6A Vkappa, CDR3

<400> 25

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vh, CDR1

<400> 26

Ser Gly Ser Ile Cys
1 5

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(19)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vh, CDR2

<400> 27

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
1 5 10 15

Leu Arg Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vh, CDR3

<400> 28

Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vkappa, CDR1

<400> 29

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vkappa, CDR2

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.12 Vkappa, CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vh, CDR1

<400> 32

Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vh, CDR2

<400> 33

Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vh, CDR3

<400> 34

Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(13)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vlambda, CDR1

<400> 35

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vlambda, CDR2

<400> 36

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13 Vlambda, CDR3

<400> 37

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 38
<211> 372

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(372)
<223> NI-101.12F6A-variable heavy (Vh) chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 38

```
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg       48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

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

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(324)
<223> NI-101.12F6A-variable kappa (Vkappa) light chain sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 40

```
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
                85                  90                  95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt                      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(121)
<223> NI-101.13A-variable heavy (Vh) chain sequence

<400> 42

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
            20                  25                  30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(121)
<223> NI-101.13B-variable heavy (Vh) chain sequence

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(107)
<223> NI-101.13A-variable light (Vl) chain sequence

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(108)
<223> NI-101.13B-variable light (Vl) chain sequence

<400> 45

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13A-variable light (Vl) chain sequence, CDR1

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13A-variable light (Vl) chain sequence, CDR2

<400> 47

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(8)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13A-variable light (Vl) chain sequence, CDR3

<400> 48

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13B-variable light (Vl) chain sequence, CDR1

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13B-variable light (Vl) chain sequence, CDR2

<400> 50

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> complementarity determining region (CDR)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of NI-101.13B-variable light (Vl) chain sequence, CDR3

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 52
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(363)
<223> NI-101.13A-variable heavy (Vh) chain sequence

<400> 52
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc 120

cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca 300

cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

<210> 53
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(363)
<223> NI-101.13B-variable heavy (Vh) chain sequence

<400> 53
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc 120

cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca 300

cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

<210> 54
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(324)
<223> NI-101.13A-variable light (Vl) chain sequence

<400> 54
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccagaacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg agatcaaacg tacg 324

<210> 55
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(327)
<223> NI-101.13B-variable light (Vl) chain sequence

<400> 55
gacatccagt tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagattcca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcgaac gttcggccaa 300

gggaccaagc tggagatcaa acgtacg 327

<210> 56
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> V_region
<222> (1)..(372)
<223> NI-101.11-variable heavy (Vh) chain sequence

<400> 56
gaggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggaactaa aaaatactat 180

acagactccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240

ctgcaaatga acaccctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg 300

ggtataggag ctcggcgggg gccgtactac atggacgtct ggggcaaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

MÉTODOS PARA SUMINISTRAR MOLÉCULAS Y OBJETIVOS DE ENLACE ESPECÍFICOS DE ENFERMEDADES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevas moléculas de enlace específicas, particularmente anticuerpos humanos, así como fragmentos, derivados y variantes de estos que reconozcan enfermedades asociadas a epítopos, incluyendo neoepítopos, de las proteínas que se derivan de las proteínas endógenas nativas, y que son frecuentes en el cuerpo de un paciente en una variante de la forma y/o fuera de su contexto fisiológico normal. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen tales moléculas de enlace, anticuerpos e imitaciones de éstos, y a métodos de detección de nuevas moléculas de enlace, que pueden ser o no ser anticuerpos, objetivos y fármacos en el tratamiento de diversos trastornos, en particular trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis y la patología beta-amiloide.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El éxito en la generación de anticuerpos monoclonales se basa en la eficiente y selectiva fusión de células B estimuladas con un antígeno con una línea celular de mieloma murino seguido por la selección de anticuerpos estables produciendo híbridos como originalmente se describe por Köhler y Milstein, Nature 256 (1975), 495-497. Sin embargo, la utilidad terapéutica de los anticuerpos basados en modelos murinos se ve obstaculizada en humanos, debido a la respuesta de los anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) a la vista de su

origen no humano. Enfoques para hacer anticuerpos humanos o anticuerpos monoclonales parecidos a humanos se encuentran disponibles a través de la ingeniería genética. Sin embargo, los métodos disponibles hasta ahora sufren el inconveniente de que no son aptos para producir los anticuerpos con las características de aquellos producidos en el curso de una respuesta inmunitaria fisiológica humana. Además, estos anticuerpos pueden no ser lo suficientemente específicos debido a la reacción cruzada con otras proteínas y/o de la proteína objetivo en el contexto de la función fisiológica normal. En el caso de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, anticuerpos que también reaccionan de manera cruzada con alta afinidad con los derivados fisiológicos de la proteína precursora amiloide (APP) o alfa sinucleina, se consideran que presentan efectos secundarios relacionados con las funciones normales de las estructuras fisiológicas objetivo. En este sentido, una enfermedad autoinmunitaria indeseada, podría ser completamente inducida -un riesgo difícilmente calculable en el diseño conceptual de los experimentos de inmunización activa que emplean las estructuras de las proteínas que, en forma de variante, también se producen fisiológicamente. Los efectos secundarios no relacionados con la estructura objetivo son, por ejemplo, reacciones anafilácticas, por ser indeseables y temidos efectos secundarios de la administración sistémica de proteínas exógenas. Según descubrimientos recientes, este puede ser también el caso con los llamados anticuerpos humanizados, que originalmente provienen de organismos no humanos, por lo general de los ratones. Por otra parte, la inmunización activa con antígenos

patológicos adecuados, tiene el riesgo considerable de generar pacientes que desarrollen anticuerpos y células T que también reconocen las variantes fisiológicas de las proteínas y, en consecuencia, dan lugar a una peligrosa e incontrolable respuesta autoinmunitaria.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar agentes que sean específicos para un objetivo implicado en un trastorno y que sean tolerados por el cuerpo humano.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de la presente invención es un método para identificar, validar y producir moléculas de enlace para el diagnóstico y que sean terapéuticamente útiles, en particular, anticuerpos que se dirijan contra las variantes patológicas de las proteínas endógenas. Más concretamente, la presente invención se refiere a un método de aislamiento de moléculas de enlace de proteínas específicas asociadas a las enfermedades compuesto por:

(a) Someter una muestra obtenida de un paciente sin síntomas, o que esté inusualmente clínicamente estable, pero que se vea afectado o en riesgo de desarrollar una enfermedad hacia un modelo de células patológicamente alteradas o tejidos con características patológicas predeterminadas; e

(b) identificar y, opcionalmente, aislar una molécula de enlace que se una al modelo, pero no a las células o los tejidos que no tengan las características patológicas, ya que pueden derivarse de un sujeto sano.

Es conocido el hecho de que, en caso de enfermedades autoinmunitarias, los anticuerpos se dirigen contra las células autólogas y proteínas u otros compuestos, tales como

glicolípidos expresados por las células, mientras evaden los conocidos mecanismos de tolerancia. También se conoce el hecho de que, en caso de desarrollos neoplásicos endógenos, una inmunidad humoral y celular hacia las células neoplásicas puede desarrollarse y, por consiguiente, lograr un mecanismo endógeno de protección inmunológica contra la degeneración del tejido neoplásico.

La presente invención hace uso del sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos también pueden estar dirigidos contra variantes relevantes fisio-patológicas de proteínas endógenas, en particular contra neo-epítopos, que se forman debido a una transcripción patológicamente alterada, traducción o modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales, procesamiento proteolítico o agregación. Estos anticuerpos se dirigen contra proteínas endógenas que, debido a su nueva estructura que se desvía de la fisiología normal, se convierten en fisio-patológicamente competentes mediante el desarrollo de efectos patológicos. Por razones de tolerancia inmunitaria, los anticuerpos relacionados con la respuesta inmunitaria correspondiente a neoepítopos en tales variantes patológicas no suelen presentar ninguna reacción cruzada contra las proteínas fisiológicas funcionales, en contraposición con el caso de enfermedades autoinmunitarias. Esto se debe a que la formación de anticuerpos con potencial de reacción cruzada es específicamente suprimida por los conocidos mecanismos de tolerancia, mientras que el desarrollo de una respuesta inmunitaria a neoepítopos patológicos puede escapar a la tolerancia.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un

nuevo enfoque para la identificación diagnóstica, terapéutica y preventiva de moléculas de enlace activas, especialmente anticuerpos y fragmentos de anticuerpos clínicamente pre-seleccionados de sujetos humanos por medio de la interacción con las estructuras patológicas identificables.

La presente invención esta dirigida contra anticuerpos o fragmentos de enlace a antígenos y moléculas de enlace similares a antígenos, que son moléculas capaces de reconocer epítopos, incluyendo neoepítopos, de proteínas asociadas a enfermedades que se derivan de las proteínas endógenas nativas y son frecuentes en el cuerpo de un paciente en forma de una variante, por ejemplo, como una proteína patológica y/o fuera de su contexto fisiológico normal. Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden los anticuerpos y a métodos inmuno-terapéuticos e inmuno-diagnósticos utilizando los mismos.

Por otra parte, en la identificación de anticuerpos, el método de acuerdo con la presente invención puede hacerse sin previa hipótesis sobre la identidad de su estructura molecular objetivo, únicamente por medio de su asociación con las estructuras patológicamente pertinentes. Además de la posibilidad de identificar de este modo las estructuras moleculares objetivo hasta ahora desconocidas para enfermedades específicas, una ventaja adicional de los anticuerpos que son exclusivamente dirigidos contra estructuras patológicas se basa en el hecho de que su disponibilidad farmacodinámica no se ve influenciada de manera negativa por el enlace a los tejidos no enfermos, de tal manera que el anticuerpo es amortiguado con respecto a su concentración y efectos de sumidero, lo que dificulta la

determinación de las concentraciones terapéuticamente eficaces. Además, el anticuerpo y las moléculas de enlace de la presente invención son preferentemente caracterizadas en la medida en que reaccionen con la forma variante de la proteína asociada a la enfermedad *in vivo* o con una célula o membrana celular, y en una sección del tejido enfermo patológicamente caracterizado, respectivamente, pero no en una significativa o menor medida con la variante fisiológica de la proteína afín, véase también, por ejemplo, el Ejemplo 2.

A partir de que la presente invención permite la identificación y aislamiento de las estructuras moleculares objetivo en células y tejidos enfermos, una modalidad adicional se refiere al antígeno y a la proteína patológica, es decir, proteína asociada a la enfermedad, respectivamente, que está unida por el anticuerpo de neoepítopo específico de la presente invención

Una modalidad particularmente preferida es un anticuerpo humano o un fragmento de enlace a antígeno del mismo, lo que demuestra las características inmunológicas de enlace de cualquiera de los anticuerpos caracterizados por las regiones variables VH y/o VL como se establece en las Tablas 2 y 3, *infra*. Alternativamente, el anticuerpo es humanizado, xenogénico o un anticuerpo quimérico humano-murino, siendo este último especialmente útil para los métodos de diagnóstico y estudios en animales. Composiciones terapéuticas que incluyen al anticuerpo o fragmentos activos de éste, o moléculas agonistas y afines, o alternativamente, antagonistas de la misma, y métodos de utilización de las composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de

una enfermedad utilizando estas composiciones también se incluyen; en donde una cantidad efectiva de la composición es administrada a un paciente que necesita el tratamiento.

El fragmento de enlace a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento Fv de una sola cadena, un fragmento F (ab´), un fragmento F (ab), y un fragmento F (ab') ^{2}, o cualquier otro fragmento de enlace a antígeno. En una modalidad específica, *infra*, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo isotipo de IgG humana.

Por supuesto, la presente invención se extiende a los linfocitos humanos inmortalizados de memoria B y células B, respectivamente, que producen el anticuerpo y que poseen las distintas y únicas características que se definen a continuación.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican, al menos, una región variable de la cadena de inmunoglobulinas del anticuerpo de la invención. De preferencia, la región variable comprende al menos una región de determinación de la complementariedad (CDR) de las regiones variables VH y/o VL que figuran en las Tablas 2 y 3, *infra*. Un conjunto correspondiente de CDRs se da en la Tabla 4 *infra*.

En consecuencia, la presente invención también incluye vectores que comprenden los polinucleótidos y células del hospedero transformadas del mismo, así como su utilización para la producción de un anticuerpo y moléculas de enlace equivalentes que son específicas para neoepítopos que son indicativos y/o causantes de un trastorno, en particular para un trastorno del cerebro como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

El anticuerpo, las cadenas de inmunoglobulinas, los fragmentos de éstos y los antígenos de enlace del anticuerpo pueden ser utilizados en composiciones farmacéuticas y de diagnóstico para la inmunoterapia y el diagnóstico respectivamente. El uso de las composiciones anteriores en la preparación de un medicamento es, sin embargo, preferible.

Por lo tanto, es un objetivo particular de la presente invención proporcionar métodos para tratar o prevenir un trastorno neurológico caracterizado por la acumulación anormal y/o el depósito de una proteína en el sistema nervioso central sin interferir con la función natural de las proteínas. Los métodos incluyen la administración de una concentración efectiva de un anticuerpo o derivado de anticuerpos al sujeto en donde el anticuerpo se une a la forma patológica de la proteína o el depósito de proteínas con una mayor afinidad que a la forma fisiológica normal de la proteína. En una modalidad preferida, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir o retardar la aparición de enfermedades asociadas con la acumulación y el depósito de los péptidos beta amiloides en un sujeto, como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, angiopatía amiloide cerebral, la demencia vascular, demencia multi-infarto. Los métodos incluyen la administración de una concentración efectiva de un anticuerpo o derivado de anticuerpos al sujeto en donde el anticuerpo se une a la forma patológica de la proteína o al depósito de proteínas con mayor afinidad que a la forma fisiológica normal de la proteína. Enfoques terapéuticos similares se prevén para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, enfermedad de

Creutzfeldt-Jakob, la fibrosis quística, la enfermedad de Gaucher y similares.

Modalidades adicionales de la presente invención se desprenderán de la descripción que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1: Anticuerpos contra la beta-amiloide. A: anticuerpos humanos. B: Tinción de control con anticuerpo conocido contra la beta-amiloide humana. Los pacientes inusualmente clínicamente estables con la enfermedad de Alzheimer contienen anticuerpos contra las placas beta-amiloide. Tinción inmuno-histoquímica con anticuerpos de pacientes inusualmente clínicamente estables en las secciones del cerebro obtenidas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer patológicamente confirmada, revela anticuerpos que se unen a las placas beta-amiloide confirmado por un conocido anticuerpo contra la beta-amiloide.

Fig. 2: Anticuerpos contra ovillos neurofibrilares. A: Anticuerpos Humanos. B: Tinción de control con anticuerpos conocidos contra tau humana. Sujetos humanos sanos contienen anticuerpos de ovillos neurofibrilares. Tinción inmuno-histoquímica con anticuerpos de sujetos sanos en las secciones del cerebro obtenidas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer patológicamente confirmada, revela anticuerpos que se unen a ovillos neurofibrilares, confirmado por un anticuerpo conocido contra el tau humano.

Fig. 3: Anticuerpos contra neuritas distróficas. A: Anticuerpos Humanos. B: Tinción de control con anticuerpos conocidos contra la tau humana. Sujetos humanos sanos contienen anticuerpos contra neuritas distróficas. Tinción

L80

inmuno-histoquímica con anticuerpos de los sujetos sanos en las secciones del cerebro obtenidas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer patológicamente confirmada, revela anticuerpos que se unen a neuritas distróficas.

Fig. 4: Anticuerpos contra la beta-amiloide. La figura muestra el enlace específica del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 que se aisló de un paciente con la enfermedad de Alzheimer clínicamente inusualmente estable, a placas beta-amiloide del cerebro. Secciones del cerebro obtenidas de un paciente con la enfermedad de Alzheimer neuropatológicamente confirmada fueron teñidos con el anticuerpo recombinante humano en la concentración indicada. El enlace del anticuerpo a las placas beta-amiloide a concentraciones de 50 pM sugiere alta afinidad de enlace.

Fig. 5: Enlace del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a las placas beta-amiloide no compitió con los poliéptidos lineales sintéticos N-terminal Abeta. El enlace del anticuerpo recombinante contra la beta-amiloide cerebral (0,5 nM) no puede competir por el polipéptido N-terminal derivado de Abeta representado en las posiciones 1 a 16, en concentraciones de hasta 1 µM.

Fig. 6: El anticuerpo recombinante humano NI-101.11 reconoce un epítopo conformacional Abeta que no está presente en Abeta monomérico. El Enlace de NI-101.11 a las placas beta-amiloides en secciones del cerebro puede ser competida por las fibras Abeta1-42, pero no por los monómeros lineales sintéticos Abeta1-42.

Fig. 7: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 no se une a monómeros lineales sintéticos Abeta en Western blots. Preparaciones de Abeta monoméricos fueron separadas

por PAGE no desnaturalizante. La transferencia de proteínas fue colocada en sondas con un anticuerpo recombinante humano contra la beta-amiloide y anticuerpos controles contra las secuencias lineales N-terminal Abeta (6E10).No se detectó ningún enlace de NI-101.11 a Abeta monoméricos. Esta observación sugiere que el anticuerpo reconoce un epítopo conformacional Abeta.

Fig. 8: El anticuerpo humano NI-101.11 se enlaza a fibrillas artificiales de amiloide preparadas a partir de péptidos Abeta1-42 sintéticos. Las fibrillas sintéticas Abeta o Abeta sintética monomérica revestido sobre placas de ELISA a densidades iguales de revestimiento, fueron incubadas con anticuerpos recombinantes humanos contra beta-amiloide cerebral en las concentraciones indicadas. La actividad de enlace del anticuerpo humano contra las fibras artificiales cerebrales beta-amiloide (cuadrados en blanco) es más de 100 veces mayor en comparación con Abeta monomérico (cuadrados en negro). El anticuerpo de control 22C4 se une preferentemente a Abeta monomérico (círculos en negro), y en menor medida a fibrillas (círculos en blanco). Esto sugiere que NI-101.11 reconoce un epítopo conformacional, que también está presente en fibrillas artificiales de amiloide preparadas a partir de péptidos sintéticos Abeta.

Fig. 9 Ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 con APP celular de larga duración o con cualquiera de sus derivados fisiológicos que se presentan en células cultivadas. En contraste con el anticuerpo de control (6E10) que se une a APP de la superficie celular, el enlace de NI-101.11 a APP de longitud completa presente en la superficie celular, está ausente.

Estos datos demuestran la ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 con APP fisiológicos celulares de longitud completa.

Figs. 10A-10C: Ausencia de enlace de NI-101.11 con Abeta monomérico vía cromatografía por exclusión de tamaños. Figuras 10A y 10B no muestran ningún enlace de NI-101.11 o un anticuerpo de control no relacionado a FITC monomérico etiquetado con Abeta1-42, mientras que la Figura 10C muestra un enlace considerable del anticuerpo 22C4 que reconoce un epítopo lineal presente en el extremo C-terminal de Abeta.

Fig. 11: ELISA de competencia mostrando que el enlace del anticuerpo 6E10, un anticuerpo dirigido contra un epítopo lineal en la región N-terminal de Abeta, podría estar completamente bloqueado con la pre-incubación con excesivas concentraciones de los péptidos monoméricos Abeta, mientras que la pre-incubación con excesivas concentraciones de estas preparaciones de péptidos monoméricos Abeta no inhiben el enlace de NI-101.11.

Fig. 12: Enlace de NI-101.13A y NI.101.13B a secciones del cerebro obtenidas del modelo de ratón transgénico Tg2676 de la enfermedad de Alzheimer.

Fig. 13: ELISA mostrando enlace preferencial de NI - 101.13A y NI-101.13B con fibrillas artificiales de amiloide en comparación con Abeta monomérico.

Fig. 14A-14B: La Figura 14A muestra el enlace del NI-101.12 recombinante con el péptido sintético Abeta1-42 a través de ELISA. La Figura 14B muestra que el enlace de NI-101.12 fue competido por un exceso del péptido Abeta1-42.

Fig. 15: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 dirigido contra la beta-amiloide cerebral, cruza la barrera

hemato-encefálica en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer, y se une a las placas beta-amiloide del cerebro *in vivo*.

Figs. 16A-16B: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 mejora el comportamiento cognitivo anormal en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer. Ratones arcAbeta de 24 meses de edad fueron tratados semanalmente ip con 3 mg/kg de anticuerpos durante 2 meses. La prueba de comportamiento del laberinto-Y se realizó antes y después de la finalización del tratamiento.

Fig. 17: Penetración de la barrera hematoencefálica y decoración de las placas de amiloide por la administración periférica de NI-101.11. NI-101.11 puede atravesar la barrera hematoencefálica y unirse a depósitos de la beta-amiloide en ratones NI-101.11 tratados (panel izquierdo), mientras que ninguna de estas manchas son visibles en los animales tratados con el anticuerpo humano de control (panel derecho). El anticuerpo humano recombinante NI 101.11 reduce la carga de placas beta-amiloide en cerebro después de un tratamiento sistémico por dos meses.

Fig. 18: La inmunización pasiva con NI-101.11 reduce la carga de beta-amiloide en ratones arcAbeta. (A, B) Los análisis de carga de placas con Tioflavina S y Rojo Congo revelan una reducción significativa de más del 50% en comparación con animales tratados con el anticuerpo de control (U de Mann-Whitney, $p = 0,02$ para la corteza, $p = 0,009$ para el hipocampo para ThioS y $p = 0.009$ para la corteza y $p = 0.04$ para el hipocampo con el análisis de Rojo Congo). Barra de escala: 200 micras (CE). El análisis de Tioflavina S demuestra una reducción significativa de la

carga de beta-amiloide (C), el número de placas beta-amiloide (D) y el promedio de tamaño de la placa (E) en ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 en comparación con animales control tratados. Estadísticas U de Mann-Whitney: p = 0.02 para la zona de la placa cortical, p = 0.009 para el área de la placa en el hipocampo, p = 0.047 para el número de placas en la corteza, p = 0.047 para número de placas en el hipocampo; p = 0.009 para el tamaño de la placa en la corteza, p = 0.009 para el número de placas en el hipocampo.

Fig. 19: La reducción de la carga de la beta-amiloide se acompaña por una disminución en la astrocitosis y la microgliosis A) La cuantificación de la tinción de los anti-GFAP reveló una reducción significativa en el número de astrocitos reactivos en la corteza de ratones arcAbeta tratados con NI-101.11, en comparación con controles transgénicos tratados. B) La cuantificación de la tinción de Iba-1 mostró una tendencia hacia un número reducido de microglía activada en ratones tratados con NI-101.11 en corteza e hipocampo. Escala de la barra: 200µm.

Fig. 20: No se observa ningún aumento en las micro hemorragias cerebrales después de dos meses de tratamiento con el anticuerpo recombinante humano NI-101.11. Ratones arcAbeta de 24 meses de edad con angiopatía congofílica amiloide masiva comprobada, fueron tratados semanalmente ip con 3 mg/kg de anticuerpo durante 2 meses. Imagen representativa de una micro hemorragia cerebral en ratones arcAbeta revelada por la tinción azul de Perl Prusia (a la izquierda). El análisis cuantitativo demuestra una frecuencia significativamente elevada de micro hemorragias en ratones transgénicos arcAbeta en comparación con los miembros

185

silvestres de la misma camada. El tratamiento crónico con NI-101.11 no se tradujo en un aumento de la frecuencia de micro hemorragias. Barra de escala: 20µm

Fig. 21: El anticuerpo humano recombinante NI-101.11 inhibe la formación de fibras sintéticas Abeta *in vitro*. El efecto del anticuerpo humano recombinante NI-101.11 en la formación de fibrillas Abeta fue analizado midiendo el enlace de Tioflavina S con agregados de Abeta mediante análisis de fluorescencia.

Fig. 22: La fagocitosis dependiente de la dosis de las fibrillas, mediada por anticuerpos FITC-Abeta1-42 por células microgliales BV-2 se midió a la búsqueda de la inhibición del sistema de receptores fagocíticos. NI-101.11 dispara una potente fagocitosis dependiente de la dosis de las fibrillas Abeta, mediada por los receptores Fcgamma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Cabe señalar que el término "a" o "una" entidad, hace referencia a una o más de esa entidad; por ejemplo, "un anticuerpo", se entiende que representan a uno o más anticuerpos. Como tal, los términos "un" (o "uno"), "uno o más", y "por lo menos uno" pueden utilizarse indistintamente en este texto.

Como se usa aquí, el término "polipéptido" está destinado a abarcar un "polipéptido" en particular, así como el plural "polipéptidos," se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente conectados por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos

o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Así, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas", "cadena de aminoácidos," o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen en la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" puede utilizarse en lugar de, o de manera intercambiable con cualquiera de estos términos.

El término "polipéptido" se pretende también para referirse a los productos de las modificaciones post-traduccionales de un polipétido, incluyendo, sin limitación a la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos conocidos de protección / bloqueo, escisión proteolítica, o modificaciones por aminoácidos que no existen de forma natural. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producida por tecnología recombinante, pero no es necesariamente traducido a partir de una secuencia de ácido nucleico designado. Puede ser generada de cualquier forma, incluso mediante síntesis química.

Un polipéptido de la invención puede ser de un tamaño de alrededor de 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1,000 o más, 2,000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen tal estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, pero que puede adoptar un gran número de conformaciones, se denominan desplegados. Como se usa aquí, el término glicoproteína se refiere a una proteína unida a

por lo menos una fracción de carbohidratos que se adjunta a la proteína a través de una cadena lateral que contiene un oxígeno o un nitrógeno del residuo del aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina o un residuo de asparagina.

Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado de ellos se entiende que es un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere de un nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede ser removido de su entorno natural o nativo. Los polipéptidos producidos por recombinación y las proteínas expresadas en células hospederas, son consideradas como aislados para fines de la invención, como lo son los polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado, o parcial o sustancialmente purificado por cualquier técnica adecuada.

En la presente invención, también se incluyen como polipéptidos, los fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos, y cualquier combinación de ellos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a los anticuerpos o polipéptidos de anticuerpos de la presente invención, incluyen a cualquier polipéptido que conserva al menos algunas de las propiedades de enlace a antígenos de la correspondiente molécula de enlace nativa, anticuerpo, o polipéptido. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de eliminación, además de fragmentos específicos de anticuerpos en este documento en otros lugares. Las variantes de los anticuerpos y los polipéptidos de anticuerpos de la presente invención incluyen fragmentos como

L88

se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias alteradas de aminoácidos, debido a las sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o inserciones. Las variantes pueden ocurrir naturalmente o pueden no ser naturales; las variantes que no son naturales pueden fabricarse por las conocidas técnicas de mutagénesis. Las variantes polipeptídicas pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, eliminaciones o adiciones. Derivados de moléculas de enlace específicas de neoepítopos, por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, son polipéptidos que se han modificado a fin de exhibir características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Las variantes de polipéptidos también pueden ser referidas en lo sucesivo, como "polipéptidos análogos". Tal como se utiliza en este documento un "derivado" de una molécula de enlace o fragmento del mismo, un anticuerpo, o un polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido que tenga uno o más residuos químicamente derivados por la reacción de un grupo funcional. Los péptidos que contengan uno o más aminoácidos de origen natural, derivados de la norma de veinte aminoácidos, también son incluídos como "derivados". Por ejemplo, la 4-hidroxiprolina puede ser substituida por prolina, la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; la 3-metillhistidina puede ser sustituida por histidina; la homoserina puede ser sustituida por serina y la ornitina puede ser sustituida por lisina.

El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico en particular, así como el plural ácidos nucleicos,

y se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o construida, por ejemplo, el ARN mensajero (ARNm) o el plásmido de ADN (pDNA). Un polinucleótido puede comprender un enlace convencional de fosfodiéster, o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como se encuentra en los péptidos de ácidos nucleicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácidos nucléicos "aislados" o polinucleótidos nos referimos a una molécula de ácido nucléico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su ambiente nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector, se considera aislado para los efectos de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado, incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospederas heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Moléculas de ARN aislado incluyen transcritos de RNA de polinucleótidos *in vivo* o *in vitro*, de la presente invención. De acuerdo con la presente invención los polinucleótidos aislados o los ácidos nucléicos incluyen también a las moléculas producidas sintéticamente. Además, los polinucleótidos o un ácido nucleico, pueden ser o pueden incluir un elemento de regulación como un promotor, un sitio de enlace a ribosoma, o una secuencia de terminación de la transcripción.

Como se usa aquí, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico, formada por codones que se traducen a aminoácidos. Aunque un "codón de paro" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede ser considerado

como parte de una región codificante, pero cualquier secuencia de acompañamiento, por ejemplo, promotores, sitios de enlace a ribosomas, secuencias de terminación de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la presente invención, pueden estar presentes en una sola construcción de polinucleótidos, por ejemplo, en un solo vector, o en construcciones de polinucleótidos separadas, por ejemplo, en distintos (diferentes) vectores.Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede constar de dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de una cadena pesada de la inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido, o un ácido nucléico de la invención, puede codificar regiones heterólogas codificantes, ya sea unido o no a un ácido nucléico que codifica a una molécula de enlace, un anticuerpo, o un fragmento, variante o derivado del mismo. Las regiones de codificación heteróloga incluyen, sin limitación, elementos o porciones especializadas, como un péptido de señal secretora o un dominio heterólogo funcional.

En algunas modalidades, los polinucleótidos o ácidos nucleicos son ADN. En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido, normalmente puede incluir un promotor y/u otro elemento de control transcripcional o traduccional asociado de forma operacional con una o más regiones codificantes. Una asociación operacional se da cuando una región codificante del producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia

con una o más secuencias regulatorias, de tal forma que sitúa la expresión del producto del gen, bajo la influencia o control de las secuencia(s) regulatoria(s). Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de un polipéptido y un promotor asociado al mismo) están "asociados operacionalmente" si la inducción de la función del promotor resulta en la transcripción del ARNm que codifica el producto del gen deseado y si la naturaleza de la ligadura entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias regulatorias de dirigir la expresión de productos génicos o interfiere con la capacidad de transcripción de la plantilla de ADN. Así, una región promotora puede asociarse operacionalmente con un ácido nucléico que codifica un polipéptido si el promotor fuese capaz de afectar la transcripción del ácido nucléico. El promotor puede ser un promotor específico de una célula que dirige la transcripción sustancial del ADN sólo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, aumentadores, los operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden estar operacionalmente asociados con los polinucleótidos para dirigir la transcripción de células específicas. Promotores adecuados y otras regiones de control transcripcional, son expuestos en este documento.

Los expertos en la materia conocen una variedad de regiones de control transcripcional. Estos incluyen, sin limitación, regiones de control transcripcional que funcionan en las células de los vertebrados, tales como, pero no limitado a, segmentos de promotor y aumentadores de los citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, en relación

con el intrón-A), virus del simio 40 (el promotor temprano), y los retrovirus (como el virus del Sarcoma de Rous). Otras regiones de control transcripcional incluyen aquellas derivados de los genes de vertebrados tales como la actina, las proteínas de choque térmico, la hormona de crecimiento bovino y la ß-globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Regiones de control transcripcional adicionales adecuadas, incluyen promotores específicos de tejido y aumentadores así como promotores inducibles de linfocina (por ejemplo, los promotores inducibles por interferones o interleucinas).

Del mismo modo, expertos en la materia, conocen una variedad de elementos de control traduccional. Estos incluyen, pero no están limitados a sitios de enlace a ribosomas, codones traduccionales de iniciación y de terminación, y los elementos derivados de los picornavirus (en particular un sitio interno de entrada en el ribosoma ó IRES, también conocido como una secuencia CITE).

En otras modalidades, un polinucleótido de la presente invención es el RNA, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Regiones codificantes de polinucleótidos y de ácidos nucléicos de la presente invención pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, quienes dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Según la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamíferos tienen un péptido de señal o una secuencia secretora líder, la cual es escindida

de la proteína madura, una vez que la exportación de la cadena en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso se ha iniciado. Los conocedores de la materia, son conscientes de que polipéptidos secretados por las células de vertebrados generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que es escindido del polipétido completo o " en toda su extensión" para producir una forma secretada o "madura". En determinadas modalidades, se utiliza un péptido de señal nativo, por ejemplo, una cadena pesada de inmunoglobulina o un péptido de señal de cadena ligera, o un derivado funcional de la secuencia que conserva la capacidad para dirigir la secreción del polipéptido que está operacionalmente asociado a ella. Alternativamente, se puede utilizar un péptido de señal heteróloga de mamíferos, o un derivado funcional de éste. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede ser sustituida por la secuencia líder del activador del plasminógeno tisular (TPA) o por la ß-glucuronidasa de ratón.

A menos que se indique lo contrario, los términos "trastorno" y "enfermedad" se utilizan por igual en este documento. Una "molécula de enlace", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere principalmente a los anticuerpos, y fragmentos de éstos, pero también puede referirse a otras moléculas que no sean anticuerpos, las cuales se unen a un neoepítopo incluyendo pero no limitando a las hormonas, receptores, ligandos, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), chaperonas tales como las proteínas de choque térmico (HSPs), así como moléculas de adhesión célula-célula, tales como miembros de las superfamilias de las caderinas, integrinas,

lectina tipo C y las inmunoglobulinas (Ig). Así pues, en aras de la claridad y sin restringir el alcance de la presente invención muchas de las siguientes modalidades se discuten con respecto a los anticuerpos y moléculas similares a los anticuerpos que constituyen las mejores moléculas de enlace para el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de la misma manera en este documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de enlace a antígeno que comprende, al menos el dominio variable de una cadena pesada, y suele estar compuesto por al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de la inmunoglobulina en los sistemas de vertebrados, están relativamente bien entendidas. Véase, por ejemplo, Harlow et al. Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ª ed. 1988).

Como se discutirá en detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia clasifican a las cadenas pesadas como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, (γ, μ, α, δ, ε) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$-$\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena lo que determina la "clase" de los anticuerpos como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc están bien caracterizadas y se sabe que confieren la especialización funcional.

Los expertos en la materia, pueden discernir entre las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos, en vista de la descripción actual y, por consecuencia, están

dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del ámbito de aplicación de la presente invención, la siguiente discusión en general se dirigirá a las moléculas de inmunoglobulinas de la clase IgG. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar, consta de dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas, con un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltones, y dos cadenas polipeptídicas pesadas con un peso molecular de 53,000-70,000. Las cuatro cadenas están unidas por lo general por enlaces "disulfuro" en una configuración de "Y" en donde las cadenas ligeras son el soporte de las cadenas pesadas a partir de la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o lambda (κ, λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse ya sea como una cadena ligera kappa o una lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones "cola" de las dos cadenas pesadas se enlazan entre sí mediante enlaces covalentes de disulfuro o enlaces no covalentes, cuando las inmunoglobulinas son generadas, ya sea por hibridomas, células B o ingeniería genética de células hospederas. En las cadenas pesadas las secuencias de aminoácidos van desde un extremo N-terminal en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta un extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena.

Tanto las cadenas ligeras, como las cadenas pesadas, se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. En este sentido, se aprecia que los dominios variables de las porciones de la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH)

determinan el reconocimiento de antígenos y la especificidad. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena de ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como la secreción, la movilidad, enlace a los receptores Fc, enlace al complemento, etc. Por convenio, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se alejan del sitio de enlace de antígenos o el extremo amino-terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden el carboxilo terminal de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer de forma selectiva y unirse de forma específica a epítopos de los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o un subconjunto de las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo, se combinan para formar la región variable que define el sitio de enlace tridimensional al antígeno. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de enlace a antígenos presentes al final de cada una de las ramas de la Y. Más concretamente, el sitio de enlace al antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas de VH y VL. Los anticuerpos o fragmentos de inmunoglobulina que contienen la estructura suficiente para unirse de manera específica a un antígeno, se expresan en este documento intercambiablemente como un "fragmento de enlace al antígeno" o un "fragmento inmuno-especifico".

En los anticuerpos de origen natural, las seis regiones que "determinan la complementariedad" o "CDR" presentes en

cada sitio de enlace a antígenos, son secuencias de aminoácidos cortas, no contiguas que están específicamente posicionadas para formar el dominio de enlace al antígeno mientras el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un medio acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de enlace al antígeno, denominados como regiones "marco", muestran una menor variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan mayormente conformaciones de láminas β y los CDR´s forman rizos que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de la lámina β. Así pues, las regiones marco actúan para formar un andamio para posicionar a los CDR´s en la orientación correcta por medio de interacciones inter-cadena y no covalentes. El domino de enlace al antígeno formado por la posición de los CDR´s, define una superficie complementaria al epítopo en el antígeno inmuno-reactivo. Esta complementariedad en la superficie promueve el enlace no covalente de los anticuerpos a su epítopo afin. Los expertos en la materia, pueden identificar fácilmente los aminoácidos que comprenden a los CDR´s y a las regiones marco, respectivamente, mediante cualquier región variable de la cadena pesada o ligera ya que se han definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest ", Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.U., (1983), y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol.., 196:901-917 (1987), que se incorpora al presente por referencia en totalidad).

En el caso de que existan dos o más definiciones de un término que se utiliza y/o es aceptado dentro de la técnica, en la definición del término que se utiliza en este documento se incluyen todos esos significados a menos que se indique lo

contrario. Un ejemplo concreto es el uso del término "región de la determinación de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación no contiguos al antígeno encontrados dentro de la región variable de ambas cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras. Esta región en particular, ha sido descrita por Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.U., " Sequences of Proteins of Immunological Interest " (1983) y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), que se incorporan al presente documento por referencia; donde las definiciones incluyen la superposición o los subconjuntos de los residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de una u otra definición para referirse a un CDR de un anticuerpo o variantes del mismo, se encuentra dentro del alcance de la expresión, tal como se define y se utiliza en este documento. La secuencia apropiada de residuos de aminoácidos que abarcan a los CDR´s, tal como se define por cada una de las referencias citadas más arriba, se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. El número exacto de residuos que abarca un CDR en particular variará dependiendo de la secuencia y el tamaño de los CDR. Aquellos expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria cuales residuos comprende un CDR en particular, tomando en cuenta la región variable de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos.

Tabla 1: Definiciones[1] de CDR

	Kabat	**Chothia**
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1] La numeración de las definiciones de todos los CDR en la Tabla 1, se realiza de acuerdo al convenio de numeración establecido por Kabat et al. (ver más abajo).

Kabat et al., también definen un sistema de numeración para los dominios de secuencias variables, que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar claramente este sistema de "numeración Kabat" a cualquier dominio de secuencia variable, sin ninguna dependencia de los datos experimentales más que de la secuencia propia. Como se usa aquí, " la numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.U., " Sequences of Proteins of Immunological Interest " (1983). Salvo indicación en contrario, las referencias a la numeración de determinadas posiciones de residuos de aminoácidos en un anticuerpo o fragmentos de enlace al antígeno, variante o derivado de la presente invención, son según el sistema de numeración Kabat.

Los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígenos, fragmentos inmunoespecíficos, variantes, o sus derivados de la invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos,

humanizados, primatizados o anticuerpos quiméricos, anticuerpos de una sola cadena, fragmentos de enlace a epítopos, por ejemplo, Fab, Fab´ y F (ab ')$_2$, Fd, Fvs, Fvs de una sola cadena (scFv) sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, Fvs de enlaces disulfuro, fragmentos compuestos ya sea por un dominio VL o uno VH, los fragmentos producidos por la expresión un Fab de biblioteca, y los anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyen, por ejemplo, desde anticuerpos (anti-Id) hasta anticuerpos divulgados en este documento). Las moléculas ScFv se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en la patente de E.U.A. 5,892,019. Las moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de la molécula de inmunoglobulina.

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención no es una IgM o un derivado de ellas con una estructura pentavalente. Particularmente, en aplicaciones específicas de la presente invención, en especial para el uso con fines terapéuticos, las IgMs son menos útiles que las IgGs y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de enlace correspondientes, ya que las IgMs debido a su estructura pentavalente y su falta de afinidad y maduración, a menudo muestran reactividades inespecíficas y muy baja afinidad.

Los fragmentos de anticuerpos, entre ellos anticuerpos de una sola cadena, pueden incluir la (s) región (es) variable (s) sola (s) o en combinación con la totalidad o una parte de las siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de enlace

a antígenos que están compuestos por cualquier combinación de la (s) región (es) variable (s) con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Anticuerpos inmunoespecíficos o fragmentos de éstos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal, incluidas las aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobayos, de camellos, de llamas, de caballos, o anticuerpos de pollos. En otra modalidad, la región variable puede ser de origen condrictio (por ejemplo, de los tiburones). Como se usa aquí, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que poseen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen a los anticuerpos aislados de pacientes humanos, de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más de las inmunoglobulinas humanas que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe infra y, por ejemplo en la patente de E.U.A.. N ° 5,939,598 por Kucherlapati et al. Un anticuerpo humano sigue siendo "humano" aún cuando se hayan sustituido aminoácidos en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de enlace.

Como se usa aquí, el término "porción de cadena pesada" incluye las secuencias de aminoácidos derivados de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de la cadena pesada, incluye al menos: un dominio CH1, un domino bisagra (por ejemplo, superior, medio, y / o región inferior de bisagra), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de enlace para el uso en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que contenga un dominio

CH1, una cadena polipeptídica que contenga un dominio CH1, por lo menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprenda un dominio CH1 y un dominio CH3, una cadena polipeptídica que comprenda un dominio CH1, por lo menos una parte de una región bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprenda un dominio CH1, por lo menos una parte de un dominio de bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra modalidad, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica compuesta por un dominio CH3. Además, un polipéptido de enlace para el uso en la invención pueden carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, la totalidad o parte de un dominio CH2). Como se indica anteriormente, se entenderá para aquellos conocedores de la materia, que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) podrán ser modificados de tal modo que su secuencia de aminoácidos varíe de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En ciertos anticuerpos o fragmentos de enlace a antígenos, variantes, o los derivados de ellos divulgados en este documento, las porciones de cadena pesada de una sola cadena polipeptídica de un polipéptido multimérico son idénticas a aquellas en una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros de la invención que contienen porciones de cadena pesada no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de enlace diferente al objetivo diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de enlace, para el uso en el diagnóstico y los métodos de

tratamiento divulgados en este documento pueden obtenerse a partir de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una región de bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de la cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa aquí, el término "porción de la cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferentemente, la porción de cadena ligera incluye al menos uno de los dominios VL o CL.

El tamaño mínimo de un péptido o epítopo polipeptídico de un anticuerpo, se piensa que es de alrededor de cuatro a cinco aminoácidos. Los péptido o epítopos polipeptídicos contienen preferentemente, como mínimo, siete, o preferiblemente al menos nueve y más preferentemente entre por lo menos unos 15 a unos 30 aminoácidos. Desde que un CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprende un epítopo no necesitan ser contiguos y, en algunos casos, pueden no estar en la misma cadena peptídica. En la presente invención, los epítopos de péptidos o polipéptido reconocidos por los anticuerpos de la presente invención contienen una secuencia de al menos 4, por lo menos 5, al menos 6, por lo menos 7, más preferiblemente de al menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 25, o

entre unos 15 a unos 30 aminoácidos Aβ contiguos o no contiguos.

El término "neoepítopo" de conformidad con la presente invención se refiere a un epítopo que es único para una enfermedad y que contiene o está formado por una proteína asociada a un trastorno que es una variante patológica de otra proteína no patológica y/o que se desvía del buen estado de salud fisiológico. Las variantes fisiopatológicas pueden formarse por medio una transcripción patológicamente alterada, traducción patológicamente alterada, modificaciones post-traduccionales, procesamiento proteolítico patológicamente alterado, formación de complejos patológicamente alterados con interacciones fisiológicas o fisiopatológicas de estructuras celulares en el sentido de una alteración de la co-localización, o conformación de estructura patológicamente alterada - como, por ejemplo, la agregación, oligomerización o fibrilación - cuyas estructuras de tres o cuatro dimensiones difieren de aquellas estructuras de la molécula fisiológicamente activa. Por otra parte, una variante fisiopatológica puede ser caracterizada en el sentido de que no se encuentra en su entorno fisiológico habitual o compartimento subcelular. Como ejemplo, los neoepítopos pueden estar situados en estructuras patológicamente conspicuas, en las áreas de los tejidos cerebrales que, evidentemente, han experimentado o ya han sufrido daño funcional. Si una determinada estructura, por ejemplo, células o tejidos, o proteínas muestran un neoepítopo, puede ser verificado al revertir el método descrito a continuación para aislar y caracterizar una molécula de enlace a una proteína asociada a trastorno específico, en la molécula de enlace, por ejemplo,

anticuerpos identificados por el método se emplean para detectar el enlace de una muestra a los anticuerpos, con lo que se determina la presencia de un neoepítopo.

Las expresiones " proteína asociada a una enfermedad específica" y "específica de neoepítopo" se utilizan aquí con el término "reconocimiento específico de un neoepítopo". Como se usan aquí los términos como "falta de reactividad cruzada", "específicos", "se reconocen expresamente", "enlace específica", "enlace preferencial", y similares se refieren a la capacidad de la molécula de enlace para discriminar entre la neoepítopo de una proteína asociada a un trastorno la proteína nativa en su forma silvestre y contexto natural. Así pues, la molécula de enlace de la presente invención tiene una afinidad preferencial por la neoepítopo sobre el antígeno de la proteína nativa en un factor de al menos dos, de preferencia al menos 5, por lo general más que por un factor de 10, en particular es preferido por un factor de 50 y aún más preferido por un factor superior a 100. Además, la K_D relativa de la molécula de enlace, por ejemplo, anticuerpos específicos para el epítopo objetivo, por ejemplo, neoepítopo es preferentemente de al menos 10 veces menos, más preferiblemente al menos 100 veces menos o más que la K_D para la enlace de ese anticuerpo con otros ligandos o a las contra partes nativas de la proteína asociada a la enfermedad.

Por "enlazado específicamente," o "reconocido específicamente," usado intercambiablemente en la presente, significa generalmente que una molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo enlazado a un epítopo por medio de su dominio enlazado al antígeno, y que el enlaza abarca alguna complementariedad entre el dominio enlazado al antígeno y el

epítopo. De acuerdo con esta definición, un anticuerpo es el que se "enlaza específicamente" a un epítopo cuando se enlaza a tal epítopo, por medio de su dominio enlazado al antígeno más rápidamente que lo que se enlazaría a un epítopo no relacionado, aleatorio. El término "especificidad" se usa en la presente para calificar la afinidad relativa por la cual un cierto anticuerpo se enlaza a un cierto epítopo. Por ejemplo, el anticuerpo "A" se puede considerar que tiene una especificidad más alta para un epítopo dado que el anticuerpo "B," o el anticuerpo "A" puede decirse que se enlaza al epítopo "C" con una especifidad más alta que la que tiene para el epítopo relacionado "D."

Por "enlazado preferiblemente," significa que la molécula de enlace, por ejemplo, el anticuerpo se enlaza específicamente a un epítopo más rápidamente que lo que se enlazaría a un epítopo relacionado, similar, homólogo, o análogo. De esta manera, un anticuerpo que se "enlaza preferiblemente" a un epítopo dado se enlazaría más posiblemente a tal epítopo que a un epítopo relacionado, aunque tal anticuerpo puede reaccionar de forma cruzada con el epítopo relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, una molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer epítopo preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la KD del anticuerpo para el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer antígeno preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud de menos que el K_D del anticuerpo para el segundo epítopo. En otro

ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer epítopo preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud de menos que el K_D del anticuerpo para el segundo epítopo.

En otro ejemplo no limitante, una molécula que enlazada, por ejemplo, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer epítopo preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una constante de afinidad (k(inactivada)) que es menos que la k(inactivada) del anticuerpo para el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer epítopo preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud de menos que la k(inactivada) del anticuerpo para el segundo epítopo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza un primer epítopo preferiblemente si enlaza el primer epítopo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menos que el k(inactivada) del anticuerpo para el segundo epítopo.

Una molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento, variante, o derivado enlazado al antígeno descrito en la presente puede decirse que se enlaza al polipéptido objetivo descrito en la presente o un fragmento o variante del mismo con una constante de afinidad (k(inactivada)) de menos que o igual a 5×10^{-2} seg^{-1}, 10^{-2} seg^{-1}, 5×10^{-3} seg^{-1} o 10^{-3} seg^{-1}. Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención puede decirse que se enlaza al polipéptido objetivo descrito en la presente o un fragmento o variante del mismo con una constante de afinidad (k(inactivada)) menos que o igual a 5×10^{-4} seg^{-1}, 10^{-4} seg^{-1}, 5×10^{-5} seg^{-1}, o 10^{-5} seg^{-1} 5×10^{-6} seg^{-1}, 10^{-6} seg^{-1}, 5×10^{-7} seg^{-1} o 10^{-7} seg^{-1}.

Una molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento, variante, o derivado enlazado al antígeno descrito en la presente puede decirse que se enlaza al polipéptido objetivo descrito en la presente o un fragmento o variante del mismo con una constante (k(activada)) de más que o igual a 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 5 X 10^3 M^{-1} seg^{-1}, 10^4 M^{-1} seg^{-1} o 5 X 10^4 M^{-1} seg^{-1}. Más preferiblemente, un anticuerpo de la invención puede decirse que se enlaza al polipéptido objetivo descrito en la presente o un fragmento o variante del mismo con una constante (k(activada)) mayor que o igual a 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 5 X 10^5 M^{-1} seg^{-1}, 10^6 M^{-1} seg^{-1}, o 5 X 10^6 M^{-1} seg^{-1} o 10^7 M^{-1} seg^{-1}.

Una molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo se dice que inhibe competitivamente el enlace de un anticuerpo de referencia a un epítopo dado si se enlaza preferiblemente a tal epítopo en una extensión que bloquea, en algún grado, el enlace del anticuerpo de referencia al epítopo. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competencia. Un anticuerpo puede decirse que inhibe competitivamente el enlace del anticuerpo de referencia a un epítopo dado por al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

Como se usa en la presente, el término "afinidad" se refiere a una medida de la resistencia del enlace de un epítopo individual con la CDR de una molécula de enlace, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina. Ver, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. 1988) en las páginas 27-28. Como se usa en la presente, el término "avidez" se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de

inmunoglobulinas y un antígeno, esto es, la resistencia combinada funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Ver, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez se refiere tanto a la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos, y también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítopo altamente repetitiva, tal como un polímero, sería uno de alta avidez.

Las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos, variantes enlazados al antígeno o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en la presente, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de la afinidad entre dos sustancias antigénicas diferentes. De esta manera, un anticuerpo es de reactividad cruzada si enlaza a un epítopo diferente al que induce esta formación. El epítopo de reactividad cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias como el epítopo de inducción, y en algunos casos, puede ajustar actualmente mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, en que unen epítopos relacionado, pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, y al menos 50% de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la

técnica y descritos en la presente) a un epítopo de referencia. Un anticuerpo puede decirse que tiene poca o no tiene reactividad cruzada si no une epítopos con menos que 95%, menos que 90%, menos que 85%, menos que 80%, menos que 75%, menos que 70%, menos que 65%, menos que 60%, menos que 55%, y menos que 50% de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) a un epítopo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un cierto epítopo, si no une ningún otro análogo, ortólogo, u homólogo de tal epítopo.

Las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos, variantes enlazados al antígeno o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de enlace a un polipéptido de la invención. Las afinidades de enlace preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd menos que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

Como se indica previamente, son bien conocidas las estructuras de subunidad y configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término "dominio VH" incluye el dominio variable de terminal amino de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer dominio de región constante (mayoría de terminal amino) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 está adyacente al el dominio VH y es de

terminal amino para la región de bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde alrededor del residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 hasta 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU; ver Kabat EA et al. op. cit. El dominio CH2 es único en que no se empareja cercanamente con otro dominio. Al contrario, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas ligadas a N entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa inactiva. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 a la terminal C de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Como se usa en la presente, el término "región de bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, de esta manera permite las dos regiones de enlace al antígeno de terminal N para movimiento de manera independiente. Las regiones de bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de bisagra superiores, medios, e inferiores (Roux et al., J. Inmunol. 161:4083 (1998)).

Como se usa en la presente el término "enlace de disulfuro" incluye el enlace coivalente formado entre dos átomos de azufre. La cisteína de aminoácido comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente de disulfuro o bridge con un segundo grupo tiol. En moléculas IgG que se presentan más naturalmente, las regiones CH1 y CL se ligan a

un enlace de disulfuro y las dos cadenas pesadas se ligan por dos enlaces de disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración Kabat (posición 226 ó 229, sistema de numeración EU).

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo preparado por ingeniería" se refiere a un anticuerpo en el cual el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada o ligera o ambas se altera por al menos el reemplazo parcial de uno o más CDRs de un anticuerpo de especificidad conocida y, si es necesario, por reemplazo de región de estructura parcial y cambio de secuencia. Aunque los CDRs pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o aún subclase como el anticuerpo del cual las regiones de estructura se derivan, se planea que los CDRs se derivarán de un anticuerpo de clase diferente y preferiblemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo preparado por ingeniería en el cual uno o más CDR "donadores" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injerta en una región de estructura de cadena ligera o pesada humana se refiere en la presente como un "anticuerpo humanizado." Puede no ser necesario reemplazar todos los CDRs con los CDRs completos de la región variable donadora para transferir la capacidad de enlace al antígeno de un dominio variable a otro. Al contrario, puede solamente ser necesario transferir aquellos residuos que sean necesarios para mantener la actividad del sitio de enlace objetivo. Dadas las explicaciones se establecen en, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, y 6,180,370, estarán bien dentro de la competencia de aquellos experimentados en la técnica, ya sea al llevar a cabo experimentación de rutina o

por prueba trial y error para obtener un anticuerpo humanizado o preparado por ingeniería funcional.

Como se usa en la presente el término "polipéptido apropiadamente plegado" incluye polipéptidos en los cuales todos de los dominios funcionales que comprenden el polipéptido están distintamente activos. Como se usa en la presente, el término "polipéptido inapropiadamente plegado" incluye polipéptidos en los cuales al menos uno de los dominios funcionales del polipéptido no está activo. En una modalidad, un polipéptido apropiadamente plegado comprende cadenas de polipéptido ligadas por al menos un enlace de disulfuro e, inversamente, un polipéptido inapropiadamente plegado comprende cadenas de polipéptido no ligadas por al menos un enlace de disulfuro.

Como se usa en la presente el término "preparado por ingeniería" incluye manipulación del ácido nucleico o moléculas de polipéptido por medios sintéticos (por ejemplo por técnicas recombinantes, síntesis de péptido *in vitro*, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas).

Como se usa en la presente, los términos "ligado," "fusionado" o "fusión" se usan intercambiablemente. Estos términos se refieren a la unión en conjunto de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Un "fusión en estructura" se refiere a la unión de dos o más estructuras de lectura abierta de polinucleótido (ORFs) para formar una ORF larga continua, en una manera que mantiene la estructura de lectura de traducción correcta de las ORF originales. De esta manera, una proteína de fusión recombinante es una proteína

sencilla que contiene dos o más segmentos que corresponden a los polipéptidos codificados por las ORF originales (cuyos segmentos normalmente no se unen en la naturaleza.) Aunque la estructura de lectura se hace de esta manera continua a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse físicamente o espacialmente por, por ejemplo, secuencia de ligadura en estructura. Por ejemplo, pueden fusionarse polinucleótidos que codifican los CDRs de una región variable de inmunoglobulina, en estructura, pero separarse por un polinucleótido que codifica al menos una región de estructura de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, de manera que los CDR "fusionados" se co-traducen como parte de un polipéptido continuo.

En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es una orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección de terminal amino hasta carboxilo en la cual los residuos que limitan uno con el otro en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

El término "expresión" como se usa en la presente se refiere a un proceso por el cual un gen produce un bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, reducción en la expresión del gen así como tanto expresión transitoria como expresión estable. Esto incluye sin limitación transcripción del gen en el ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia (tARN), ARN de horquilla pequeña (shARN), ARN de transferencia pequeña (siARN) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de tal mARN en los polipéptidos. Si el

producto deseado final es un bioquímico, la expresión incluye la creación de tal bioquímico y cualquiera de los precursores. La expresión de un gen produce un "producto de gen." Como se usa en la presente, un producto de gen puede ser ya sea un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce de un transcripto. Los productos del gen descritos en la presente incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones después de la traducción, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones después de la traducción, por ejemplo, metilación, glicosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, desdoblamiento proteolítico, y similares.

Como se usa en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o mediciones preventivas, en donde el objeto es prevenir o disminuir lentamente (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como el desarrollo o extensión de cáncer. Los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilizar el estado de la enfermedad (esto es, sin empeoramiento), retardar o disminuir la progresión de la enfermedad, aliviar o mitigación del estado de la enfermedad, y remisión (si es parcial o total), si es detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prologar la sobrevivencia cuando se compara con la sobrevivencia esperada si no recibe tratamiento. Aquellos que necesitan de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección o trastorno así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o

aquellos en los cuales la manifestación de la afección o trastorno es para prevenirse.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero," significa cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para quién se desea diagnosticar, pronosticar, prevención, o terapia.

II. Métodos para identificar moléculas de enlace

La presente invención generalmente se refiere a medios y métodos para descubrir anticuerpos terapéuticamente efectivos de sujetos humanos clínicamente preseleccionados. Como se demuestra en los ejemplos, los anticuerpos humanos contra estructuras anormales en enfermedades del cerebro humano se pueden aislar de pacientes clínicamente de manera inusual estables, o fenotípicamente saludables y los anticuerpos recombinantes correspondientes se pueden usar exitosamente para el tratamiento, alivio de patología y prevención de la insuficiencia de la función cerebral sin efectos colaterales substanciales. La estabilidad clínica o sin progresión de la enfermedad se puede identificar a manera de ejemplo al medir sobre el tiempo el estado clínico, por ejemplo, cognitivo (por prueba neuropsicológica, por ejemplo); evaluación del nivel funcional global; evaluación de las capacidades de existencia diaria o deficiencias del comportamiento; análisis volumétrico de las estructuras del cerebro; medición *in vivo* de depósitos patológicos de proteínas anormales en el cerebro (por ejemplo formación de imágenes de PET beta-amiloide) o variables bioquímicas en los fluidos corporales (por ejemplo proteínas tau, o péptidos Abeta); y al comparar el curso/historia natural de la enfermedad. De esta manera, la

217

presente invención proporciona anticuerpos y moléculas de enlace que son capaces de reconocer neoepítopos de las proteínas asociadas con la enfermedad que se derivan de proteínas endógenas nativas, y están prevalentes en el cuerpo de un paciente en una forma variante, por ejemplo como una proteína patológica y/o fuera de su contexto fisiológico normal. En particular, los anticuerpos y fragmentos enlazados al antígeno de los mismos se proporcionan, que demuestran las características de enlace inmunológicas y/o propiedades biológicas como se resume para el anticuerpo ilustrado en los Ejemplos. Donde se presente, el término "características de enlace inmunológicas," u otras características de enlace de un anticuerpo con un antígeno, en todas de sus formas gramáticas, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada, y otras características de enlace de un anticuerpo. Naturalmente, la presente invención se extiende a las líneas celulares que producen el anticuerpo y células recombinantes también. La presente invención se refiere además a ensayos de diagnostico y kits que comprenden la molécula de enlace de la presente invención y a métodos terapéuticos y evaluaciones terapéuticas con base en ellos.

La presente invención es con base en la observación de que en sujetos y pacientes humanos preseleccionados de acuerdo con el criterio clínico específico, quienes portan un riesgo de desarrollar un trastorno neurológico tipo enfermedad de Alzheimer debido a su edad, con relación a la defensa humoral, anticuerpos para variantes patofisiológicas endógenas tipo agregados de péptido Abeta, ovillo neurofibrilar, neuritas distróficos y estructuras celulares adicionales también se pueden encontrar, que son

neuropatológicamente característicos para el trastorno. Estas estructuras se pueden encontrar solas o en combinación con otras estructuras patológicas y pueden, como en el caso de los agregados Abeta y los precursores de los ovillos neurofibrilares, desarrollan efectos patológicos. Sin embargo, aquellos anticuerpos específicamente reconocen las estructuras que no muestran o muestran reactividad cruzada significativamente inferior a las formas normales fisiológicamente funcionales de las proteínas fundamentales para las estructuras patológicas, contrario al caso conocido de una respuesta autoinmunitaria.

Sin pretender apegarse a la teoría esto es, con base en los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención, se cree que un trastorno no se ha manifestado ni es fenotípicamente perceptible, como en el caso de una infección, con objeto de resultar en una actividad experimentalmente medible del sistema inmunitario humoral similar a la generación o activación de células B específicas o células de la memoria B. En el caso de células de tumor o células diferenciadas, que se han dispuesto fisiológicamente de, mecanismos son ya conocidos, en donde los compañeros tipo células auxiliares T4 y células T citotóxicas y células exterminadoras naturales del sistema inmunitario celular cooperan en la inducción de apoptosis. Se ha asumido que, también en un humano saludable, las células de tumor o precursores de las mismas se forman en una base diaria por medio de mutación. Sin embargo, estas se conducen inmediatamente a apoptosis por medio de mecanismos humorales y celulares, de manera que un tumor no es detectable. En este sentido, un "paciente saludablemente, o clínicamente

inusualmente estable" no se entiende para denotar un individuo en quién sin los eventos de la enfermedad toma lugar, pero un individuo en quién los eventos de la enfermedad diversos se controlan por mecanismos de bloqueo o defensa antes de que se manifiestan fenotípicamente por sí mismos.

En vista de lo anterior, se hace la hipótesis de acuerdo con la presente invención que debe ser posible identificar un anticuerpo o una células que produzcan anticuerpos de los colectivos de paciente específico o sujetos saludables, que se han preseleccionado de acuerdo con el criterio clínico, sin precognición de la naturaleza molecular de un epítopo de estructura objetivo, por ejemplo neoepítopo, en donde el anticuerpo, en el caso de que ya prevalece la tolerancia en el organismo del donador - que es, por ejemplo, demostrado por la ausencia de autoinmunidad - deberá exitosamente emplearse contra una enfermedad en forma de un agente recombinantemente producido. La identificación de tal anticuerpo puede de esta manera conducirse sin precognición del epítopo molecular de la estructura objetivo, pero al contrario únicamente por medio de enlace a neoepítopos de estructuras patológicamente visibles en secciones de tejido clínico-patológicamente bien caracterizadas derivadas de pacientes humanos o de modelos animales de la enfermedad respectiva.

En consecuencia, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para aislar una molécula de enlace específico a la proteína asociado con el trastorno que comprende:

(a) someter una muestra obtenida de un paciente que está libre de síntomas, o que está de manera clínica

inusualmente estable, pero que está afectado con o en riesgo de desarrollar un trastorno o efectivamente de manera sorpresiva la manifestación o erupción de un trastorno para un espécimen de células o tejido patológicamente o fisiológicamente alterado de características clínicas predeterminadas; y

(b) identificar y opcionalmente aislar una molécula de enlace que se enlaza preferiblemente al espécimen pero sin o con afinidad significativamente inferior para células o tejidos correspondientes sin tales características patológicas como pueden derivarse de un sujeto saludable.

El método de la presente invención se puede realizar como se resume en la sección de Ejemplos con medios bien conocidos para una persona experimentada en la técnica. Por ejemplo, una muestra líquida obtenida del paciente se puede pasar a través de una primera abertura de un conducto que está en contacto con la estructura objetivo del espécimen firmemente mantenido en un sujetador objetivo, por ello permite a las moléculas de enlace supuestas presentes en la muestra, ya sea en una forma soluble o expresadas en la superficie celular y membrana, respectivamente, para enlazar a la estructura objetivo. La muestra líquida puede contener por ejemplo linfocitos y/o anticuerpos mientras que el espécimen puede ser una sección de tejido o una membrana recubierta con moléculas o combinaciones moleculares que son distintas para una estructura objetivo patológica.

Cualquier materia no enlazada se puede remover por medio de la segunda abertura del conducto. Al mismo tiempo, la temperatura del sujetador objetivo se puede controlar por un termostato de sujetador objetivo, por ejemplo a una

221

temperatura en la cual el enlace natural de la molécula de enlace supuesta al neoepítopo del antígeno específico para el espécimen toma lugar en el cuerpo humano. Por medio del movimiento de flujo, por ejemplo pasar la muestra de líquido que contiene moléculas de enlace, preferiblemente a temperatura corporal sobre los sistemas naturales de estructura objetivo de interacciones de enlace se puede simular. Sin embargo, otros métodos para incubar la muestra con el espécimen tal como por medio de un agitador o comprimido rotatorio se puede usar también. Una muestra particular del sistema mencionado arriba es que permite una interrupción de los procesos metabólicos en cualquier tiempo al disminuir la temperatura del sujetador objetivo por medio del termostato de sujetador objetivo. Al hacerlo, la temperatura del sujetador objetivo puede disminuirse hasta por ejemplo 2-10°C, en particular 4°C. Un dispositivo correspondiente que se puede usar de acuerdo con el método de la presente invención se describe en la Solicitud de Patente Europea EP 1 069 431 A2. Aquí, el método de la presente invención permitirá la identificación y caracterización de los compañeros de enlace así como al mismo tiempo identificar y caracterizar las clases moleculares, grupos moleculares y/o partes moleculares requeridas para el proceso de enlace, esto es las estructuras objetivo del espécimen, que hasta ahora puede ser desconocido. Esto no solamente abrirá nuevas formas posibles de de diagnostico, sino también proporcionará un nuevo sistema de prueba para los enfoques terapéuticos en un nivel molecular.

Ya que un paciente puede calificar de acuerdo con la presente invención para un grupo de voluntarios saludables si

no obstante, los marcadores sustitutos específicos predicen una alta probabilidad de un estado de una enfermedad, que de manera sorpresiva - y posiblemente debido a una respuesta inmunitaria endógena específica - no se manifiesta clínicamente. En este sentido, como se relaciona a diversas enfermedades, un humano envejecido saludable deberá ser un individuo, en el cual una enfermedad neurodegenerativa tipo enfermedad de Alzheimer o mal de Parkinson aún no sea manifestado clínicamente, pero en el cual el desarrollo preclínico de las variantes de proteína patofisiológicas, esto es proteínas asociadas con la enfermedad, y en el sentido antes mencionado por medio de la intervención temprana del sistema inmunitario humoral con o sin el involucramiento de componentes celulares del sistema inmunitario, se ha restringido o retardado para tal extensión que, hasta el momento cuando el paciente saludable, pero no preclínico participa en el estudio, la manifestación clínica de la enfermedad aún no ha ocurrido. Preferiblemente, los voluntarios discretos en quienes ninguno de los procesos autoinmunológicos se han diagnosticado ni otras posibles afecciones patológicas ocurren como efectos colaterales se reclutan cómo donadores para la muestra en el primer ejemplo.

En principio las muestras de los pacientes se pueden usar, que han experimentado una inmunización activa con variantes de proteínas o péptidos fisiológicos, en donde el anticuerpo desarrollado se ha fomentado por la inmunización. Los anticuerpos, por ejemplo, se pueden identificar y aislar de los pacientes con enfermedad de Alzheimer que se han vacunado con péptido Abeta. Ver para por ejemplo, Hock et al., Nature Medicine 8:1280-1275 (2002), Hock et al., Neuron

38:547-554 (2003), y WO 2004/095031, cada una incorporada en la presente para referencia en sus totalidades. Sin embargo, se pueden preferir usar muestras de voluntarios que no han recibido tal inmunización o se asocia con y/o es causal de la medicación correspondiente que concierne el trastorno de la proteína patológica de variante.

De acuerdo con la presente invención, las muestras de un paciente, por ejemplo de individuos que se han preseleccionado clínicamente se analizan por la presencia de moléculas de enlace que reconocen específicamente el espécimen de las estructuras patológicamente visibles, por ejemplo en tejido ex vivo de pacientes humanos clinico-patológicamente caracterizados o modelos animales tipo, por ejemplo, ratones transgénicos, o estructuras celulares *in vitro*, o en tejidos alogénicos o xenogénicos patológicos. Preferiblemente, el paciente y/o el sujeto que proporciona el espécimen son humanos, más preferiblemente ambos.

La muestra, célula o espécimen de tejido característico patológicamente o fisiológicamente alterado se muestra preferiblemente por detección óptica después de la reacción con una molécula de enlace, por ejemplo el anticuerpo de la presente invención. El espécimen se puede obtener como/de una muestra de célula, sección de tejido, citología células, muestra células o de tejido de un modelo animal de una enfermedad humana o material de tejido y celular cultivado *in vitro*. Preferiblemente, al menos uno del espécimen se presenta en un sujetador objetivo en forma de posiciones de barrido, en donde cada posición de barrido corresponde a una estructura patológica específica y al menos dos de las posiciones de barrido se exponen concomitantemente a la

detección de una reacción con el anticuerpo. A manera de ejemplo, los anticuerpos para los distintivos neuropatológicos de tales enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer, mal de Parkinson o tauropatías - incluyendo placas de beta-amiloide, cuerpos de Lewy, ovillos neurofibrilares y neuritis distrófica se pueden detectar en secciones obtenidas de tejidos del cerebro de la autopsia humana con diagnósticos clínico-patológicamente confirmados de las entidades de la enfermedad respectiva. Esto se hace al montar pequeñas barras de tejido incrustado en parafina en los portaobjetos de vidrio que luego se prueban con muestras de un paciente o donador saludable. La detección de una reacción con el anticuerpo se hace siguiendo procedimientos estándar de barrido inmunohistoquímicamente y microscópico.

Las microsecciones de tejido múltiples que contienen varios tejidos de la enfermedad humana se pueden ensamblar en el portaobjetos de vidrio para formar una microconfiguración de tejido múltiple. De manera similar, los especímenes humanos de las muestras de tejido de modelos animales de la enfermedad humana, la citología células o las células se pueden incrustar en parafina y montar en el portaobjetos solas o en combinación con configuraciones de tejido o tejido del cerebro de la enfermedad de Alzheimer en la autopsia humana. De esta manera, una posición de prueba sencilla en el portaobjetos puede comprender configuraciones mezcladas de tejido y otras estructuras patológicamente visibles que muestran el espécimen.

Con objeto de incrementar el desempeño del ensayo, más de una posición de prueba se monta en un portaobjetos.

Preferiblemente, ocho posiciones de prueba se montan en el portaobjetos en un formato de dos por cuatro adaptado al formato de microtitulación o de 96 pozos. Una descripción más detallada de esta microconfiguración de tejido compatible con la microconcentración se puede encontrar infra en la sección de los métodos complementarios a continuación.

Como se menciona la muestra a ser analizada puede comprender un fluido corporal, una muestra celular o el sobrenadante de una muestra celular o un derivado del mismo. Los fluidos corporales tales como fluido cerebroespinal lumbar (CSF), plasma u orina se puede recolectar siguiendo los procedimientos clínicos estándar después de documentar un consentimiento de los pacientes. Más preferiblemente, la muestra comprende o se deriva de células B o células B de memoria y/o comprenden anticuerpos.

Preferiblemente, el paciente se ha determinado para ser afectado con un trastorno aún no manifestado o está en riesgo de desarrollar el trastorno por la presencia o ausencia de un marcador indirecto, o por un curso de la enfermedad inestablemente estable. Los criterios clínicos son para considerarse en conexión con marcadores indirectos que tienen ya sea una probabilidad incrementada de la ocurrencia o la manifestación de una enfermedad de acuerdo con la presente invención en el sentido de una afección preclínica, o, viceversa, probando la improbabilidad de tal enfermedad ya que ha ocurrido como, por ejemplo, una constelación genética que promueve la enfermedad presente o una exposición extrema o la forma de vida hacen probable el desarrollo fenotípico de una enfermedad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer esto significa que, de acuerdo con la presente invención, tales

226

voluntarios humanos se investigan para células B o células B de memoria contra complejos de proteína asociados con neuropatológia tipo agregados Abeta, especies Abeta oligoméricos y fibrilos de beta-amiloide en placas de beta-amiloide, para filamentos tau en ovillos neurofibrilares, para la sinucleina alfa en cuerpos Lewy o los componentes hasta ahora no identificados molecularmente que, con respecto a la edad, pertenece a un grupo de individuos en quienes ya sea que la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer es alta particularmente o quienes se originan genéticamente de una población que porta un riesgo alto para la enfermedad de Alzheimer. Estos son, por ejemplo, personas mayores de 75 años que no tienen o. solamente tienen insuficiencias cognitivas marginales neuropsicológicamente medibles, o en el caso de indicaciones de tumor, las personas que tienen marcadores de tumor altamente indicativos, por ejemplo marcadores del tumor de gen, pero no padecen de la enfermedad (Alloul et al., Arch. Gerontology Geriatrics 27 (1998), 189; Dunn et al., Immunity 21 (2004) 137-148). En el caso de insuficiencia cognitiva suave, estos son pacientes que han permanecido clínicamente, neuropsicológicamente, o cognitivamente estables durante los años a pesar de su riesgo estadístico anual de más de 20% para desarrollar un enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta clínicamente y es progresiva en el curso adicional. De esta manera, en una modalidad el marcador indirecto se selecciona del grupo que consiste de la vejez, carga de amiloide en el cerebro, genotipo ApoE, genotipo APP, genotipo PS1, niveles en los fluidos corporales de péptido Abeta, isoprostanos, Tau, y fosfo-Tau.

227

Un enfoque particular al emplear el método de conformidad con la presente invención es muestras de prueba de células B y células de memoria B de voluntarios clínicamente preseleccionados contra configuraciones del espécimen de tejidos patológicamente visibles de enfermedades enteramente diferentes o enfermedades primarias relacionadas. En particular, tales tejidos particulares originados de pacientes humanos que padecen de enfermedades neurodegenerativas, enfermedades de plegamiento inadecuado de proteínas, amiloidosis de tejido y otras enfermedades relacionadas con los depósitos patológicos, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades hiperproliferativas y neoplásticas, por ejemplo, tumores, enfermedades de almacenamiento y enfermedades de inclusión así como de modelos animales de enfermedades humanas, en particular de ratones alterados con genes humanos patológicamente relevantes.

En una modalidad particularmente preferida, la presente invención enfoca una enfermedad de Alzheimer. En esta modalidad, la muestra se obtiene de un sujeto preferiblemente que cumple con el siguiente criterio:

a) tiene 65, preferiblemente 70 y más preferiblemente 75 años de edad o más viejo;

b) tener capacidad cognitiva completa y buena salud; y

c) no tener señales clínicas de demencia; o

d) tener velocidades inusualmente bajas de progresión de la enfermedad a pesar de la presencia de un diagnóstico clínico establecido de la probable enfermedad de Alzheimer; o

e) tener velocidades de conversión inusualmente bajas de Insuficiencia Cognitiva Media (MCI) hasta una enfermedad

de Alzheimer completamente desarrollada.

En una modalidad adicional, el método de la presente invención comprende además las etapas de:

a) purificar células B o células de memoria B de una muestra que se ha identificado que contiene moléculas de enlace, por ejemplo anticuerpos que preferiblemente enlazan al espécimen pero sin o con afinidad significativamente inferior para células o tejido correspondiente de un sujeto saludable;

b) obtener el repertorio del gen de inmunoglobulina que codifica los anticuerpos de las células B o células de memoria B; y

c) usar el repertorio para expresar los anticuerpos, y opcionalmente en donde la etapa (b) comprende las etapas de:

d) obtener un mARN de las células B o células B de memoria;

e) obtener cADN del mARN de la etapa (iv); y

f) usar una reacción de extensión del cebador para amplificar del cADN los fragmentos que corresponden a las cadenas pesadas (HC) y las cadenas ligeras kappa/lambda (LC) de los anticuerpos.

Los métodos para producir clones de una célula B humana inmortalizada y linfocitos de memoria B, comprenden la etapa de transformar linfocitos de memoria B humanos usando Virus Epstein Barr (EBV, por sus siglas en inglés) en presencia de un activador de célula B policlonal se resumen en la Solicitud Internacional WO2004/076677. Esta Solicitud Internacional también describe métodos para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de interés, que comprende las etapas de preparar un clon de

229

célula B inmortalizado y obtener/procesar por secuencia ácido nucleico del clon de célula B que codifica el anticuerpo de interés e insertar además el ácido nucleico en o usando el ácido nucleico para preparar una hospedero de expresión que puede expresar el anticuerpo de interés, cultivar o sub-cultivar el hospedero de expresión bajo condiciones donde el anticuerpo de interés se expresa y, opcionalmente, purificar el anticuerpo de interés. No hace falta decir que el ácido nucleico se puede manipular en el intermedio para introducir los sitios de restricción, para cambiar el codón usado, y/o agregar u optimizar la transcripción y/o secuencias reguladoras de traducción. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico se pueden generar por traducción inversa de las secuencias de polipéptido de la presente invención usando software tal como software NTI de vector para generar secuencias de ácido nucleico que se optimizan del codón y se optimizan para la estabilidad del ARN. Todas estas técnicas son establecidas en la técnica y se pueden realizar por la persona experimentada en la técnica sin problemas indebidos. Los métodos adicionales de células B humanas inmortalizadas son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la construcción de hibridomas humanos o hibridomas quiméricos de humanos-murino.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de enlace que es capaz de reconocer selectivamente un epítopo de una proteína asociada a la enfermedad incluyendo un neoepítopo de una proteína asociada a la enfermedad, que preferiblemente se puede obtener o validar por el método de la presente invención descrito anteriormente e se ilustra en los ejemplos. De manera

230

ventajosa, la molécula de enlace de la presente invención no reconoce substancialmente la proteína en su forma asociada sin el trastorno; ver también supra.

Los medios y métodos para la producción recombinante de moléculas de enlace, en particular anticuerpos e imitadores de los mismos así como métodos de separación por exclusión para moléculas de enlace de competencia, que pueden o no pueden ser anticuerpos, se conocen en el arte y se resumen, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO2006/103116 con respecto a anticuerpos contra beta-amiloide y el tratamiento/diagnostico de la enfermedad de Alzheimer, el contenido de la descripción de la cual se incorpora en la presente para referencia para este propósito de preparar por ingeniería el anticuerpo y la administración para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

Sin embargo, como se describe en la presente, en particular con respecto a aplicaciones terapéuticas en humanos el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano. En este contexto, la proteína patológica variante reconocida por el anticuerpo se asocia preferiblemente con un trastorno neurológico, preferiblemente un trastorno del cerebro.

Además, como se demuestra en los Ejemplos 3 hasta 5 la molécula de enlace de la presente invención, en particular un anticuerpo tiene diversas propiedades biológicas ventajosas una o más de las cuales se han realizado por la presente invención por el primer tiempo, por ejemplo es capaz de:

(i) cruzar la barrera hematoencefálica, por ejemplo en el sitio del evento patológico;

(ii) enlazar las placas de beta-amiloide, amiloide

cerebrovascular, depósitos de Abeta difusos, ovillos neurofibrilares, tau hiperfosforilado, cuerpos de Lewy positivos de alfa-sinucleina o agregados de proteína asociados con neuritas distróficos;

(iii) remover placas beta-amiloide en el cerebro y/o prevenir la formación de placas de amiloide en el cerebro;

(iv) comportamiento normal substancialmente restablecido; y/o

(v) no provocar microhemorragias.

En una modalidad preferida particular, el anticuerpo o molécula de enlace equivalente de la presente invención se puede distinguir de otros anticuerpos por una o más de las siguientes propiedades, por ejemplo son capaces de:

1. pasar, al menos en cantidades pequeñas, la barrera hematoencefálica en el sitio de los eventos patológicos;

2. enlazar a una o más estructuras extracelulares o celulares patofisiológicamente relevantes;

3. permitir la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante *in vitro* o *in vivo*;

4. permitir la reducción de la estructura patofisiológicamente relevante y la reducción de una toxicidad asociada con ella;

5. permitir bloquear o retardar un proceso de la enfermedad;

6. permitir la regeneración de funciones celulares y específicas del órgano y del organismo y posiblemente para una prevención secundaria de la recurrencia de la patofisiología original después de la degradación de la toxicidad conectada con la estructura patofisiológicamente relevante; y/o

232

7. no se asocia con microhemorragias incrementadas.

Además, la ausencia de reactividad cruzada con precursores o derivados fisiológicos lleva a la consecuencia de que, primeramente, se evitan las concentraciones que se predicen como *sink effects* en estructuras de tejido saludables y, segundo, que las respuestas autoinmunitarias en el sentido de efectos colaterales indeseados substancialmente se pierden. Además, los reportes previos sugieren una asociación de angiopatía amiloide cerebral (CAA) con reactividad vascular comprometida en un modelo de ratón transgénico con CAA (Mueggler et al., J Neurosci 22 (2002), 7218-24.). La CAA severa ocurre en ratones arcAβ viejos (Knobloch et al., Neurobiol. Aging 28:1297-1306 (2007) epub 31 de Julio de 2006) puede de esta manera inhibir la flexibilidad vasodilatadora de vasos sanguíneos afectados. De acuerdo con la presente invención es prudente esperar que el tratamiento con los anticuerpos de la presente invención pueden mejorar la vasoreactividad y el flujo sanguíneo cerebral en ratones transgénicos APP envejecidos. Esto puede ser valido al usar el modelo de ratón arcAβ descrito en Knobloch et al. (2006), supra, y descrito en la Solicitud de EUA "Transgenic animal model for Alzheimer's disease" by Grimm et al., número de serie 60/934,291 presentada el 11 de Junio de 2007, el contenido descrito de la cual se incorpora en la presente para referencia.

III. Anticuerpos

La presente invención se dirige además a las moléculas de enlace por ejemplo anticuerpos y fragmentos enlazados, variantes, y derivados de los mismos mostrados en la Tabla 2

y 3. La presente invención se dirige más específicamente a un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante o derivados de los mismos, donde el anticuerpo enlazado específicamente al mismo neoepítopo de una proteína asociada al trastorno como un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste de NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, y NI-101.13B.

La invención se lleva además a un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante o derivados de los mismos, donde el anticuerpo inhibe competitivamente un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste de NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, y NI-101.13B del enlace al neoepítopo de una proteína asociada con el trastorno.

La invención también se lleva a un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante o derivados de los mismos, donde el anticuerpo comprende un dominio de enlace al antígeno idéntico a aquel de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, y NI-101.13B.

La presente invención ejemplifica además diversas moléculas de enlace, por ejemplo anticuerpos y fragmentos enlazados de los mismos, que se pueden caracterizar al comprender en su región variable, por ejemplo dominio enlazado con al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable VH y/o VL que comprende cualquiera de una de las secuencias de aminoácido descritas en la Tabla 2 (VH) y Tabla 3 (VL).

Tabla 2: Secuencias de aminoácido de la región V_H de

234

anticuerpos específicos de neoepítopo.

Anticuerpo	Secuencia de cadena pesada variable
NI-101.10	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGIHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKKY YTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGTT VTVSS (SEQ ID NO: 4)
NI-101.11	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKK YYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO: 6)
NI-101.12	EVQLVESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSIRSGSICWYWIRQPPGKGLEWIGYFCYSGATFY TPSLRGRLTISVDASKNQLSLSLSSVTAADTAVYYCARRAGENSGGIEPYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 10)
NI-101.13	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTY YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 14)
NI-101.12F 6A	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTKK YYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO: 39)
NI-101.13A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42)
NI-101.13B	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRRSYYWGWIRQSPGKGLEWSGSIHYSGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSRWGSSWVFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Tabla 3: Secuencias de aminoácido para la región VL de anticuerpos específicos de neoepítopo.

Anticuerpo	Secuencia de cadena ligera variable (kappa o lambda
NI-101.10	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.11	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 8)
NI-101.12	DEIVLTQSPSSLSASIGDRVTITCRASESINKYVNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGAPSRV SGSGFGRDFSLTISGLQAEDFGAYFCQQSYSAPYTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 12)
NI-101.13	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQPPGTAPKLLIYRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG (SEQ ID NO: 16)
NI-101.12F 6A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 41)
NI-101.13A	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTRTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 44)
NI-101.13B	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQIPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNSYSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO: 45)

Las secuencias de nucleótido correspondientes que codifican las regiones variables identificadas arriba se establecen en el listado de secuencias anexo. Un conjunto ejemplar de CDRs de las secuencias de

aminoácido de arriba de la región VH y/o VL como se describen en las Tablas 2 y 3 se dan en la Tabla 4. Sin embargo, como se discute en lo siguiente la persona experimentada en la técnica está bien consiente del hecho de que se pueden usar además o alternativamente CDRs, que difieren en su secuencia de aminoácido de aquellos establecidos en la Tabla 4 por uno, dos, tres o aún más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

Tabla 4: Denominación de las secuencias de proteína CDR en la nomenclatura Kabat de las regiones VH y VL de los anticuerpos específicos de neoepítopo.

Anticuerpo	Cadena Pesada Variable	Variable light chain
NI-101.10		
CDR1	SYGIH (SEQ ID NO: 17)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 18)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 19)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.11		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.12		
CDR1	SGSIC (SEQ ID NO: 26)	RASESINKYVN (SEQ ID NO: 29)
CDR2	WIGYFCYSGATFYTPSLRG (SEQ ID NO: 27)	AASSLQS (SEQ ID NO: 30)
CDR3	RAGENSGGIEPYYGMDV (SEQ ID NO: 28)	QQSYSAPYT (SEQ ID NO: 31)
NI-101.13		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 35)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 36)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	AAWDDSLSGYV (SEQ ID NO: 37)
NI-101.12F6A		
CDR1	SYGMH (SEQ ID NO: 20)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 23)
CDR2	VIWFDGTKKYYTDSVKG (SEQ ID NO: 21)	AASSLQS (SEQ ID NO: 24)
CDR3	DRGIGARRGPYYMDV (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 25)
NI-101.13A		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 46)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	AASSLQS (SEQ ID NO: 47)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	QQSYSTRT (SEQ ID NO: 48)
NI-101.13B		
CDR1	RRSYYWG (SEQ ID NO: 32)	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 49)
CDR2	SIHYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 33)	KASSLES (SEQ ID NO: 50)
CDR3	SRWGSSWVFDY (SEQ ID NO: 34)	QQYNSYSRT (SEQ ID NO: 51)

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácido de la región VH y/o VL como se describe en las Tablas 2 y 3. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento enlazado al antígeno del mismo, que compite para enlazar al neoepítopo con al menos uno de los anticuerpos que tienen la región VH y/o VL como se describe en las Tablas 2 y 3. Aquellos anticuerpos pueden ser de murino también, sin embargo, los anticuerpos humanizados, xenogénicos, o de humano-murino quiméricos se prefieren, en particular para aplicaciones terapéuticas. Un fragmento enlazado al antígeno del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento $F(ab')_2$. Para algunas aplicaciones solamente las regiones variables de los anticuerpos se requieren, que se pueden obtener al tratar el anticuerpo con reactivos adecuados para generar porciones Fab', Fab, o $F(ab'')_2$. Tales fragmentos son suficientes para uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que involucran acoplar las porciones inmunoespecíficas de las inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

La presente invención se dirige además a polipéptidos aislados que hacen los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención comprenden polipéptidos, por ejemplo, secuencias de aminoácido que codifican las regiones enlazadas al antígeno específico derivadas de moléculas de inmunoglobulina. Un polipéptido o

secuencia de aminoácido "derivada de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido que tiene una cierta secuencia de aminoácido. En ciertos casos, el polipéptido o secuencia de aminoácido que se deriva de un polipéptido o secuencia de aminoácido de inicio particular tiene una secuencia de aminoácido que es idéntica esencialmente a aquel de la secuencia de inicio, o una porción del mismo, en donde la porción consiste de al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, al menos 30-50 aminoácidos, o que es de otra manera identificable para alguien de experiencia ordinaria en la técnica que tiene su origen en la secuencia de inicio.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH), donde al menos uno de VH-CDRs de la región variable de cadena pesada o al menos dos de los VH-CDRs de la región variable de cadena pesada son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a las secuencias de aminoácido de VH-CDR1, VH-CDR2 o VH-CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos descritos en la presente. Alternativamente, las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 de la VH son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a las secuencias de aminoácido de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos descritos en la presente. De esta manera, de acuerdo con esta modalidad una región variable de la cadena pesada de la invención tiene secuencias de polipéptido VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 con relación a los grupos mostrados en la Tabla 4, supra. Mientras que la Tabla 4 muestra VH-CDRs definidos por el sistema Kabat, otras

definiciones de CDR, por ejemplo, VH-CDRs definido por el sistema Chothia, también se incluyen en la presente invención, y pueden fácilmente identificarse por una persona de experiencia ordinaria en la técnica usando los datos presentados en las Tablas 2 y 3.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) en la cual las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) en la cual las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los Grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis substituciones de aminoácido en cualquiera de VH-CDR. En ciertas modalidades las substituciones de aminoácido son conservadoras.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), donde al menos uno de los VL-CDRs de la región variable de cadena ligera o al menos dos de los VL-CDRs de la región variable de cadena ligera son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a las secuencias de aminoácido de VL-CDR1, VL-CDR2 o VL-CDR3 de cadena ligera de

los anticuerpos descritos en la presente. Alternativamente, las Regiones VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de la VL son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a las secuencias de aminoácido de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 de cadena ligera de los anticuerpos descritos en la presente. De esta manera, de acuerdo con esta modalidad una región variable de cadena ligera de la invención tiene secuencias de polipéptido de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 con relación a los polipéptidos mostrados en la Tabla 4, supra. Mientras que la Tabla 4 muestra los VL-CDRs definidos por el sistema Kabat, otras definiciones de CDR, por ejemplo, VL-CDRs definidos por el sistema Chothia, también se incluyen en la presente invención.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulinuna (VL) en la cual las regiones VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VL) en la cual las regiones VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 mostrados en la Tabla 4, excepto por una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis substituciones de aminoácido en cualquiera de VL-CDR. En ciertas modalidades las substituciones de aminoácido son conservadoras.

Organizacion y
Digitalizacion

PATENTE DE INVENCIÓN

09-81882

2/2

Una inmunoglobulina o sus cADN codificados se pueden modificar además. De esta manera, en una modalidad adicional el método de la presente invención comprende cualquiera de las etapas de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, anticuerpo bi-específico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de cualquiera de estos. Los métodos correspondientes se conocen por la persona experimentada en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando los derivados de los anticuerpos se obtienen por la técnica de despliegue de despliegue de fagos, resonancia de plasmón de superficie como se emplea en el sistema BIAcore se puede usar para incrementar la eficiencia de los anticuerpos de fago que enlazan al mismo epítopo como aquel de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Inmunol. Métodos 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, Solicitud Europea EP-A1 0 239 400 y Solicitud Internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizarse de acuerdo con la presente invención se nombra anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe en, por ejemplo, Solicitudes Internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se describe arriba, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de

141

formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y $F(ab)_2$, así como en cadenas sencillas; ver por ejemplo Solicitud Internacional WO88/09344.

Los anticuerpos de la presente invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes se pueden modificar además usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, al usar eliminaciones, inserciones, substituciones, adiciones y/o recombinaciones del aminoácido y/o cualquiera de las otras modificaciones conocidas en la técnica ya sea solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN fundamental de la secuencia de aminoácido de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por la persona experimentada en la técnica; ver, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones de estructura, y modificaciones de terminal N y C incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y el enlace de porciones de carbohidrato o lípido, cofactores, y similares. Similarmente, la presente invención abarca la producción de de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en la terminación amino fusionado a la molécula heteróloga tal como un ligando inmunoestimulador en la terminación carboxilo; ver, por ejemplo, Solicitud Internacional WO00/30680 para

142

detalles técnicos correspondientes.

Adicionalmente, la presente invención abarca péptidos pequeños incluyendo aquellos que contienen una molécula de enlace como se describe arriba, por ejemplo que contiene la región CDR3 de la región variable de cualquiera de los anticuerpos mencionados, en particular CDR3 de la cadena pesada ya que se ha observado frecuentemente que el CDR3 de cadena pesada (HCDR3) es la región que tiene un grado mayor de variabilidad y una participación predominante en la interacción del anticuerpo al antígeno. Tales péptidos pueden fácilmente sintetizarse o producirse por medios recombinantes para producir un agente de enlace útil de acuerdo con la invención. Tales métodos son bien conocidos para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. Los péptidos se pueden sintetizar por ejemplo, usando sintetizadores de péptido automáticos que están comercialmente disponibles. Los péptidos se pueden producir por técnicas recombinantes al incorporar el ADN que expresa el péptido en un vector expresión y transformar células con el vector de expresión para producir el péptido.

Aquí, la presente invención se refiere a cualquier molécula de enlace, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento enlazado que se obtiene de acuerdo con medios descritos arriba y muestra las propiedades mencionadas, esto es que reconoce específicamente un neoepítopo. Tales anticuerpos y moléculas de enlace se pueden probar para su especificidad y afinidad enlazada al por ejemplo usar el método de aislar moléculas de enlace específicas de neoepítopo como se describen en la anteriormente.

Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas

directamente del cultivo de células B o células de memoria B inmortalizadas, las células inmortalizadas se pueden usar como una fuente de ubicación de cadena ligera y cadena pesada reconfigurada para la expresión posterior y/o manipulación genética. Los genes del anticuerpo reconfigurado pueden ser transcritos inversos de mARN apropiados para producir cADN. Si se desea, la región constante de cadena pesada puede intercambiarse para que de un isotipo diferente o eliminado por completo. Las regiones variables se pueden ligar para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Las regiones Fv múltiples se pueden ligar para conferir la capacidad de enlace a más de una de las combinaciones de cadena ligera y pesada objetivo o quimérica se pueden emplear. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de los análogos como se describe arriba que mantiene tanto su capacidad para enlazar el objetivo deseado es sencillo. Los métodos para la clonación de las regiones variables de anticuerpo y la generación de anticuerpos recombinantes se conocen por la persona experimentada en la técnica y se describen, por ejemplo, Gilliland et al., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que el material genético apropiado se obtiene y, si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias de codificación, incluyendo aquellas que codifican, en un mínimo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera, se pueden insertar en los sistemas de expresión contenidos en los vectores que se pueden transfectar en las células hospederas recombinantes estándar. Una variedad de tales células hospederas se pueden usar; para el procesamiento eficiente, sin embargo, las células

mamíferas se prefieren. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan a, células CHO, células HEK 293, o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo luego se compromete al cultivar el hospedero recombinante modificado bajo condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células hospederas y la expresión de las secuencias codificadas. Los anticuerpos luego se recuperan al aislarse del cultivo. Los sistemas de expresión se diseñan preferiblemente para incluir péptidos de señal de manera que los anticuerpos resultantes se secretan en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

Una vez que la estructura objetivo, por ejemplo la proteína asociada a la enfermedad se ha etiquetado por la muestra y la molécula de enlace respectiva en ella se puede identificar por medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo usando técnicas espectrométricas de masa (MS) tales como aquellas descritas en la Solicitud Internacional WO00/11208 y específicamente aquellas descritas en Hock et al., Nat Med 8 (2002), 1270-1275; Hock et al., Neuron 38 (2003), 547-554. De esta manera, en el caso del anticuerpo identificado de acuerdo con la presente invención produce enlaces *in vitro* a las estructuras patológicas, por ejemplo a placas de beta-amiloide en secciones del área del cerebro patológicas, pero no significativamente en tejidos saludables, un candidato de anticuerpo prometedor se ha identificado que se ha identificado de aquella estructura objetivo molecular puede posteriormente enriquecerse y purificarse por medio de sus propiedades enlazadas al anticuerpo de tejidos patológicos y, como un resultado, se

puede identificar y caracterizar por medio de métodos espectrométricos de masa y analíticos de proteína, tipo por ejemplo MALDI/TOF (Williams, Methods Cell. Biol. 62 (2000), 449-453; Yates, J. Mass. Spectrom. 33 (1998), 1-19).

En consecuencia, en otra modalidad la presente invención se refiere a un antígeno que se reconoce por la molécula de enlace, especialmente el anticuerpo de la presente invención se describe anteriormente, y que preferiblemente es al menos parte de una proteína asociada con el trastorno.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica la molécula de antígeno o enlazada de la presente invención, en el caso del anticuerpo preferiblemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo se describe arriba. Típicamente, la región variable codificada por polinucleótido comprende al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) del VH y/o VL de la región variable del anticuerpo. La persona experimentada en la técnica conoce que cada dominio variable (VH de cadena pesada y VL de cadena ligera) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, algunas veces nombradas regiones determinantes de la complementariedad o "CDR" flanqueados por cuatro regiones de estructura relativamente conservadoras o "FR" y se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables para el enlace del antígeno. Las hiperregiones variables o CDRs del subtipo IgG humano del anticuerpo comprenden residuos de aminoácido de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe por Kabat

et al., Sequences of Proteins of Inmunological Interest, 5a Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) y/o aquellos residuos de un rizo hipervariable, por ejemplo residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917. Los residuos de estructura o FR son aquellos residuos de dominio variable diferentes a y asociados a las regiones hipervariables. El término "enlace específico" se refiere al anticuerpo enlazado a un antígeno predeterminado. Típicamente, el enlace del anticuerpo con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y el enlace al antígeno predeterminado con un K_D que es al menos dos veces menos que su K_D para el enlace a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína, o cualquier otro polipéptido específico) diferente al antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan intercambiablemente en la presente con el término "un anticuerpo que enlaza específicamente a un antígeno". Como se usa en la presente, enlace "altamente específico" significa que el KD relativo del anticuerpo para el epítopo objetivo específico, por ejemplo neoepítopo es al menos 10 veces menos que el K_D para el enlace del anticuerpo a otros ligandos o para la contraparte nativa de la proteína asociada con la enfermedad.

La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibode-

Antigen Interactions" In Fundamental Inmunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Inmunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), y métodos descritos en la presente. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo para un antígeno incluyen ELISA, RIA, y resonancia de plasmón de superficie. La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. De esta manera, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de enlace al antígeno, por ejemplo, K_D, IC_{50}, se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas del anticuerpo y antígeno, y una solución amortiguadora estandarizada.

La persona experimentada en la técnica fácilmente apreciará que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito arriba se puede usar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad deseada y función biológica. De esta manera, la presente invención también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden al menos un CDR del dominio variable descrito arriba y que ventajosamente tiene substancialmente las mismas o similares propiedades de enlace como el anticuerpo descrito en los ejemplos anexos. La persona experimentada en la técnica apreciará fácilmente que usando los dominios variables o CDRs descritos en la presente los anticuerpos se pueden construir de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Solicitudes de Patente Europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, la persona experimentada en la técnica conoce que la afinidad de enlace se puede aumentar al hacer substituciones de

aminoácido dentro de los CDR o dentro de los rizos hipervariables (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que parcialmente se traslapan con los CDR como se define por Kabat. De esta manera, la presente invención también se refiere a anticuerpos en donde uno o más de los CDR mencionados comprenden una o más, preferiblemente no más de dos substituciones de aminoácido. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención comprende una o más de sus cadenas de inmunoglobulina dos o los tres CDR de las regiones variables como se establece en la Tabla 4.

Las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención, como se conocen por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, el enlace del componente C1 del complemento para una región constante del anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonisación y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede involucrarse en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos enlazados a los receptores en varias células por medio de la región Fc, con un sitio de enlace del receptor Fc en el enlace de la región Fc del anticuerpo a un receptor Fc (FcR) en una célula. Existen un número de receptores Fc que son específicos para las diferentes clases del anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores de epsilón), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). El enlace del anticuerpo a los receptores Fc en los disparadores de las

superficies celulares un número de respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo sumergimiento y destrucción de partículas que recubren el anticuerpo, depuración de complejos inmunes, lisis de células objetivo recubiertas con el anticuerpo por células exterminadoras (nombradas citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia de placenta y control de la producción de inmunoglobulina.

En consecuencia, ciertas modalidades de la invención incluyen un anticuerpo, o fragmento, variante, o derivado enlazado al antígeno del mismo, en el cual al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se han eliminado o de otra manera alterado para proporcionar características biológicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas, capacidad para dimerizarse no covalentemente, incrementar la capacidad para localizarse en el sitio de un tumor, reducir la vida media del suero, o incrementar la vida media del suero cuando se compara con un anticuerpo no alterado, completo de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para uso en los métodos de diagnostico y tratamiento descritos en la presente son anticuerpos eliminados del dominio que comprenden una cadena de polipéptido similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carece al menos de una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado se eliminará, por ejemplo, todo o parte del dominio CH2 se eliminará. En otras modalidades, ciertos anticuerpos para uso en los métodos de

diagnostico y tratamiento descritos en la presente tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada IgG, que se altera para eliminar la glicosilación, con referencia en cualquier otra parte de la presente como anticuerpos aglicosilados o "agli". Tales anticuerpos "agli" se pueden preparar enzimáticamente así como por preparación por ingeniería de los sitios de glicosilación de consenso en la región constante. Mientras que no se enlace por la teoría, se cree que los anticuerpos "agli" pueden tener una seguridad mejorada y perfil de estabilidad *in vivo*. Los métodos para producir anticuerpos aglicosilados, que tienen función efectora deseada se encuentran por ejemplo en WO 2005/018572, que se incorpora como referencia en su totalidad.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en la presente, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de las mutaciones de punto u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir el enlace del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante por ello incrementa la localización del tumor. En otros casos puede ser que las modificaciones de la región constante consistentes con el enlace de complemento moderado de la invención actual y de esta manera reducir la vida media del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante se pueden usar para modificar ligaduras de disulfuro o porciones de oligosacárido que permiten aumentar la localización debido a la especificidad del antígeno incrementado o la flexibilidad del

231

anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tal como localización del tumor, biodistribución y vida media del suero, pueden fácilmente medirse y cuantificarse usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

Las formas modificadas de los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden hacer de precursores completos o anticuerpos precursores usando técnicas conocidas en el arte. Las técnicas ejemplares se discuten en más detalle a continuación.

En ciertas modalidades tanto las regiones variables como constantes de los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención son completamente humanas. Los anticuerpos completamente humanos pueden hacerse usando técnicas que se conocen en el arte y como se describen en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico se pueden preparar al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir tales anticuerpos en respuesta al enfrentamiento antigénico, pero aquellas ubicaciones endógenas se han deshabilitado. Las técnicas ejemplares que se pueden usar para hacer tales anticuerpos se describen en las patentes de E.U.A.: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140. Otras técnicas se conocen en el arte. Los anticuerpos completamente humanos pueden similarmente producirse por varias tecnologías de despliegue, por ejemplo, despliegue de fagos u otros sistemas de despliegue víricos, como se describen en más detalle en

cualquier otra parte de la presente.

Los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden hacer o fabricar usando técnicas que se conocen en el arte. En ciertas modalidades, las moléculas del anticuerpo o fragmentos de las mismas se "producen recombinantemente," esto es, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas ejemplares para hacer las moléculas del anticuerpo o fragmentos de las mismas se discuten en más detalle en cualquier otra parte de la presente.

Los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, por el enlace covalente de cualquier tipo de molécula para el anticuerpo de manera que el enlace covalente no previene al anticuerpo de enlazarse específicamente a su epítopo cognado. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, desdoblamiento proteolítico, ligadura a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se pueden llevar a cabo por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a desdoblamiento químico específico, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En ciertas modalidades, los anticuerpos, o fragmentos de

enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención no producirán una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal a ser tratado, por ejemplo, en un humano. En ciertas modalidades, las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos enlazados al antígeno de los mismos de la invención se derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano, y se usan posteriormente en las mismas especies de las cuales se derivan, por ejemplo, humano, aliviando o minimizando la ocurrencia de las respuestas inmunes perjudiciales.

La des-inmunización también se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en la presente, el término "des-inmunización" incluye alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de célula T (ver, por ejemplo, WO9852976A1, WO0034317A2). Por ejemplo, las secuencias VH y VL del anticuerpo de inicio se analizan y un "mapa" del epítopo de célula T humana de cada región V muestra la ubicación de los epítopos con relación a las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítopos de célula T individuales del mapa del epítopo de célula T se analizan con objeto de identificar substituciones de aminoácido alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Un rango de las secuencias VH y VL alternativas se diseñan que comprenden combinaciones de las substituciones de aminoácido y estas secuencias se incorporan posteriormente en un rango de los polipéptidos enlazados, por ejemplo, anticuerpos específicos de neo-epítopo o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para uso en los métodos de diagnostico y tratamiento descritos en la presente, que luego

se prueban para la función. Típicamente, entre 12 y 24 anticuerpos variantes se generan y prueban. Los genes de cadena pesada y ligera completos comprenden regiones C humanas y V modificadas luego se clonan en los vectores de expresión y los plásmidos posteriores introducidos en las líneas celulares para la producción del anticuerpo completo. Los anticuerpos luego se comparan con ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y la variante óptima se identifica.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte incluyendo el uso de tecnologías de despliegue de hibridoma, recombinante, y de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma incluyendo aquellas conocidas y enseñadas en el arte, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. (1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981) (las referencias se incorporan para referencia en sus totalidades). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un clon sencillo, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico, o de fago, y sin el método por el cual se produce. De esta manera, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte. En ciertas modalidades, los anticuerpos

de la presente invención se derivan de las células B humanas que se han inmortalizado por medio de la transformación con virus Epstein-Barr, como se describe en la presente.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler et al., Nature 256:495 (1975)) los linfocitos relativamente de vida corta, o mortales de un mamífero, por ejemplo, las células B derivadas de un sujeto humano como se describen en la presente, se fusionan con una línea celular de tumor inmortal (por ejemplo, una línea células de mieloma), de esta manera, producen células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo genéticamente codificado de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas sencillas por la selección, dilución, y se hacen crecer nuevamente con cada cepa individual que comprenden los genes específicos para la formación de un anticuerpo sencillo. Los anticuerpos producidos, que son homogéneos contra un antígeno deseado y, con referencia a su ascendencia genética pura, se nombran "monoclonales."

Las células de hibridoma de esta manera preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más substancias que inhiben el crecimiento o sobrevivencia de las células de mieloma parenterales, no fusionadas. Aquellos experimentados en la técnica apreciarán que están bien establecidos los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas están comercialmente disponibles de un número de fuentes y protocolos estandarizados. Generalmente, el medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se hacen crecer se procesa por

ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. La especificidad de enlace de los anticuerpos monoclonales producida por células de hibridoma se determina por ensayos *in vitro* tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA), o ensayos de enlace de neoepítopo como se describen en la presente. Después las células de hibridoma se identifican que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitados y hacer crecer por métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp 59-103 (1986)). Se apreciará además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los fragmentos del anticuerpo que reconocen los epítopos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ se pueden producir recombinantemente o por desdoblamiento proteolítico de las moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Los fragmentos $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Los anticuerpos completamente humanos, tales como se describen en la presente, particularmente son deseables para

tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden hacer por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de despliegue de fagos descritos arriba usando las colecciones del anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulina humanas. Ver también, Patentes de E.U.A. Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y Publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741; cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, de pacientes quienes están libres de síntomas pero afectados con el riesgo de desarrollar un trastorno, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, o un paciente con el trastorno pero con un curso de la enfermedad inusualmente estable.

En otra modalidad, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales deseados se pueden fácilmente aislar y procesar por secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, al usar sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazar específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de murino). Las células de hibridoma aisladas u subclonadas sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aisladas, el ADN se puede colocar en los vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospederas procarióticas o eucarióticas tales como, pero no limitadas a, células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en la

presente) se puede usar para las secuencias de región constante y variable del clon para la manufactura de anticuerpos como se describe en Newman et al., Patente de E.U.A. No. 5,658,570, presentada el 25 de Enero de 1995, que se incorpora como referencia en la presente. Esencialmente, esta detalla la extracción de ARN de las células seleccionadas, la conversión de cADN, y amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en la Patente de E.U.A. No. 5,658,570. También se discuten en más detalle a continuación, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado se pueden hacer crecer en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

En una modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos un CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos dos CDR de una o más de las moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos tres CDR de una o más de las moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos cuatro CDR de una o más de las moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos cinco CDR de una o más de las moléculas de anticuerpo. En otra modalidad, un anticuerpo de la invención comprende al menos seis CDR de una o más de las moléculas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo ejemplares comprenden al menos un CDR que se puede incluir en los anticuerpos sometidos como se describen en la presente.

En una modalidad específica, la secuencia de aminoácidos

de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera se pueden revisar para identificar las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) por métodos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, al comparar las secuencias de aminoácido conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de la hipervariabilidad de secuencia. Usando técnicas de ADN recombinantes de rutina, uno o más de los CDR se pueden insertar dentro de las regiones de la estructura, por ejemplo, en regiones de estructura humana. Las regiones de estructura pueden ser regiones de estructura de consenso o que se presentan naturalmente, y preferiblemente regiones de estructura humana (ver, por ejemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) para un listado de regiones de estructura humana). En ciertas modalidades, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones de estructura y los CDR que codifican un anticuerpo que se enlaza específicamente a al menos un epítopo de un polipéptido deseado. En ciertas modalidades, una o más substituciones de aminoácido se pueden hacer dentro de las regiones de estructura, para, por ejemplo, mejorar el enlace del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales métodos se pueden usar para hacer substituciones o eliminaciones del aminoácido de uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace de disulfuro de intercadena para generar las moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces de disulfuro de intercadena. Otras alteraciones para el polinucleótido se abarcan por la presente invención y están dentro de la experiencia de la técnica.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de E.U.A. No. 4,694,778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman al ligar los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv por medio de un puente de aminoácido, que resulta en un anticuerpo de cadena sencilla. Las técnicas para el ensamble de fragmentos Fv funcionales en E coli también se pueden usar (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).

En otra modalidad, los linfocitos se pueden seleccionar por micromanipulación y aislar los genes variables. Por ejemplo, las células mononucleares sanguíneas periféricas se pueden aislar de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un humano, y cultivado durante alrededor de 7 días *in vitro*. Los cultivos se pueden separar por exclusión para los IgG específicos que cumplen el criterio de separación por exclusión. Se pueden aislar las células de pozos positivos. Las células B que producen Ig individual se pueden aislar por FACS o al identificarlas en un ensayo de placa hemolítica mediada por el complemento. Las células B que producen Ig se pueden micromanipularse en un tubo y los genes VH y VL se pueden amplificando usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes VH y VL se pueden clonar en un vector de expresión de anticuerpo y transferirse en células (por ejemplo, células eucarióticas o procarióticas) para la expresión.

Alternativamente, las líneas celulares que producen

anticuerpos se pueden seleccionar y cultivar usando técnicas bien conocidas para el técnico experimentado. Tales técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para uso en la invención como se describen a continuación se describen en Current Protocols in Inmunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) que se incorpora en la presente para referencia en su totalidad, incluyendo complementos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferiblemente, por técnicas de expresión recombinante como se describen en la presente.

En una modalidad, un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en donde uno o más dominios se eliminan parcialmente o completamente ("anticuerpos eliminados del dominio"). En ciertas modalidades los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos eliminados del dominio o variantes en donde el dominio CH2 se ha removido (constructos ΔCH2). Para otras modalidades un péptido conectado corto se puede substituir por el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Aquellos experimentados en la técnica apreciarán que tales constructos se prefieren particularmente debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en la velocidad catalítica del anticuerpo. Los constructos eliminados del

dominio se pueden derivar usando un vector que codifica un dominio constante humano IgG1 (ver, por ejemplo, WO 02/060955A2 y WO02/096948A2). Este vector se prepara por ingeniería para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa un dominio que elimina la región constante IgG1.

En ciertas modalidades, los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos se pueden hacer usando métodos descritos en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de EUA 5,837,821 o WO 94/09817A1).

En una modalidad, un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene eliminación o substitución de un poco o aún un aminoácido sencillo de manera que permite la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un aminoácido sencillo en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir substancialmente el enlace de Fc y por ello incrementar la localización del tumor. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente tal parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo enlace de complemento) para modularse. Tales eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media del suero) mientras que permiten otras funciones deseadas asociadas con el dominio de región constante del sujeto intacto. Además, como se alude arriba, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de la mutación o substitución de uno

o más aminoácidos que aumentan el perfil del constructo resultante. A este respecto puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de enlace conservado (por ejemplo enlace Fc) mientras que substancialmente mantiene la configuración y perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Aún otras modalidades comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para aumentar las características deseadas tales como función efectora o proporcionar más citotoxina o enlace de carbohidrato. En tales modalidades puede ser deseado insertar o replicar las secuencias específicas derivadas de los dominios de región constante seleccionados.

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de, variantes (incluyendo derivados) de las moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en la presente, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos inmunoespecíficamente enlazan a un polipéptido asociado con el trastorno o fragmento o variante de los mismos. Las técnicas estándar conocidas para aquellos de experiencia en la técnica se pueden usar para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que resulta en las substituciones de aminoácido. Preferiblemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos que 50 substituciones de aminoácido, menos que 40 substituciones de aminoácido, menos que 30 substituciones de aminoácido, menos que 25 substituciones de aminoácido, menos que 20 substituciones de aminoácido, menos que 15 substituciones de

aminoácido, menos que 10 substituciones de aminoácido, menos que 5 substituciones de aminoácido, menos que 4 substituciones de aminoácido, menos que 3 substituciones de aminoácido, o menos que 2 substituciones de aminoácido con relación a la región VH de referencia, VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, región VL, VL-CDR1, VL-CDR2, o VL-CDR3. Una "substitución de aminoácido conservadora" es una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Las familias de los residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales con cargas similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales ramificadas con beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente juntas todas o parte de la secuencia codificada, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden separar por exclusión para la actividad biológica para identificar mutantes que mantienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de enlazar un polipéptido asociado con el trastorno).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solamente

en las regiones de estructura o solamente en regiones CDR de una molécula del anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silenciosas o mutaciones sin sentido neutras, por ejemplo, no tienen, o tienen poco, efecto en una capacidad del anticuerpo para enlazar el antígeno, ciertamente algunas de tales mutaciones no alteran la secuencia de aminoácido en absoluto. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codón, o mejorar una producción del anticuerpo de hibridoma. Las regiones codificadas optimizadas por codón que codifican los anticuerpos de la presente invención se describen en cualquier otra parte en la presente. Alternativamente, las mutaciones sin sentido no neutras pueden alterar una capacidad del anticuerpo para enlazar al antígeno. La ubicación de más mutaciones sin sentido silenciosas y neutras es probable para estar en las regiones de estructura, mientras que la ubicación de más mutaciones sin sentido no neutras se probable para estar en CDR, aunque esto no es requerimiento absoluto. Alguien de experiencia en la técnica debe ser capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como sin alteración en la actividad enlazada al antígeno o alteración en la actividad enlazada (por ejemplo, mejoras en la actividad enlazada al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede de manera rutinaria expresarse y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada, (por ejemplo, capacidad para enlazar inmunoespecíficamente al menos un epítopo de un polipéptido asociado con el trastorno) se puede determinar usando técnicas descritas en la presente o al modificar de manera rutinaria técnicas conocidas en el

arte.

IV. Polinucleótidos que codifican Anticuerpos

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a una polinucleótido que codifica una molécula de enlace de la presente invención, por ejemplo, un anticuerpo. En el caso de del anticuerpo el polinucleótido puede codificar al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito arriba. El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito arriba puede ser, por ejemplo, ADN, cADN, ARN o ADN o ARN sintéticamente producido o una molécula de ácido nucleico quimérico recombinantemente producido que comprende cualquiera de aquellos polinucleótidos ya sea solos o en combinación. Preferiblemente el polinucleótido es parte de un vector. Tales vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula hospedera adecuada y bajo condiciones adecuadas. Preferiblemente, el polinucleótido de la invención se liga operablemente para las secuencias de control de expresión permitiendo la expresión en células procarióticas o eucarióticas. La expresión del polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un mARN traducible. Los elementos regulatorios aseguran la expresión en células eucarióticas, preferiblemente células mamíferas, son bien conocidos por aquellos experimentados en la técnica. Usualmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcripto. Los elementos reguladores adicionales pueden

incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales, y/o regiones promotoras heterólogas o asociadas naturalmente.

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede componer de cualquier poliribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede componer de ADN de hebra sencilla y doble, el ADN que es una mezcla de regiones de hebra sencilla y doble, ARN de hebra sencilla y doble, y ARN que es una mezcla de regiones de hebra sencilla y doble, moléculas hibridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de hebra sencilla o, más típicamente, de hebra doble o una mezcla de regiones de hebra sencilla y doble. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede componer de regiones de hebra triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas bases o estructuras de ADN o ARN modificadas por estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Una variedad de modificaciones se pueden hacer para ADN y ARN; de esta manera, "polinucleótido" abarca formas químicamente, enzimáticamente, o metabólicamente modificadas.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no

natural de un polipéptido derivado de un inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de cadena pesada de inmunoglobulina o porción de cadena ligera) se puede crear al introducir una o más substituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido en la secuencia de nucleótido de la inmunoglobulina de manera que una o más substituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido, se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir por técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las substituciones de aminoácido conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácido no esenciales.

Como es bien conocido, el ARN se puede aislar de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas por técnicas estándar, tales como extracción de isotiocianato de guanidinio y precipitación seguida por centrifugación o cromatografía. Donde es deseado, el mARN se puede aislar del ARN total por técnicas estándar tales como cromatografía en celulosa dT oligo. Las técnicas adecuadas son familiares en el arte.

En una modalidad, los cADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo puede hacerse, ya sea simultáneamente o separadamente, usando transcriptasa inversa y polimerasa de ADN de acuerdo con los métodos bien conocidos. El PCR puede iniciarse por los cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos con base en la cadena de ADN pesada y ligera publicada y las secuencias del aminoácido. Como se discute arriba, el PCR también puede usarse para aislar el ADN que codifica el anticuerpo de las cadenas ligera y pesada. En este caso las

colecciones pueden seleccionarse por los cebadores de consenso o sondas homólogas grandes, tales como sondas de región constante de ratón.

El ADN, típicamente el ADN de plásmido, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en la técnica, mapeo de restricción y secuenciado de acuerdo con las técnicas bien conocidas estándar establecidas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relacionadas a las técnicas de ADN recombinantes. Para el curso, el ADN puede ser sintético de acuerdo a la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislado o análisis posterior.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH), donde al menos uno de los CDRs de la región variable de cadena pesada o al menos dos de los VH-CDRs de la región variable de cadena pesada son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia la cadena pesada n VH-CDR1, VH-CDR2, o VH-CDR3 secuencias de aminoácido de los anticuerpos descritos en la presente. Alternativamente, las regiones VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 del VH son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a secuencias de aminoácido VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 de cadena pesada de los anticuerpos descritos en la presente. De esta manera, de acuerdo con esta modalidad una región variable de la cadena pesada de la invención tiene las secuencias de polipéptido VH-CDR1, VH-CDR2, ó VH-CDR3 relacionadas a las secuencias de polipéptido mostradas en la Tabla 4.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un

polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), donde al menos uno de los VL-CDRs de la región variable de cadena ligera o al menos dos de los VL-CDRs de la región variable de cadena ligera son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticos con referencia a las secuencias de aminoácido de los anticuerpos VL-CDR1, VL-CDR2, ó VL-CDR3 de cadena ligera descritos en la presente. Alternativamente, las regiones VL-CDR1, VL-CDR2, y VL-CDR3 del VL son al menos 80%, 85%, 90% ó 95% idénticas con referencia a las secuencias de aminoácido de los anticuerpos VL-CDR1, VL-CDR2, y VL-CDR3 de cadena ligera descritos en la presente. De esta manera, de acuerdo con esta modalidad una región variable de cadena ligera de la invención tiene las secuencias de polipéptido VL-CDR1, VL-CDR2, ó VL-CDR3 relacionadas a las secuencias de polipéptido mostradas en la Tabla 4.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) en la cual las regiones VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 mostrados en la Tabla 4.

Como se conoce en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o dos polinucleótidos se determina por comparar la secuencia de aminoácido o ácido nucleico de un polipéptido o polinucleótido para la secuencia de un segundo polipéptido o polinucleótido. Cuando se discute en la presente, si cualquier polipéptido particular es al

menos alrededor de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% idéntico a otro polipéptido puede determinarse usando los métodos y programas de computadora/software conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). El BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre las dos secuencias. Cuando se usa el BESTFIT o cualquier otra secuencia del programa de alineación para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo a la presente invención, los parámetros que se establecen, por supuesto, tal que el porcentaje de idéntica se calcula durante la longitud total de la secuencia del polipéptido de referencia y que los espacios en la homología hasta 5% del número total de los aminoácido en la secuencia de referencia se permiten.

Tabla 5: Secuencias del polinucleótido de la región V_H de los anticuerpos específicos del neoepitopo

Anticuerpo	Secuencia de cadena pesada variable
NI-101.10 (SEQ ID NO:3)	GAGGTGCAGCTAGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATACACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.11 (SEQ ID NO:56)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Anticuerpo	Secuencia de cadena pesada variable
NI-101.11 (SEQ ID NO:5) (codón optimizado)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCGGCCGGAGCCTGCGGCTGAG CTGCGCCGCCAGCGGCTTCGCCTTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGG CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCGTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGACCGGGGCATCGGCGCCCGG CGGGGCCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
NI-101.12 (SEQ ID NO:9)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCGCCGAGACCCTGAGCCTGACC TGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCCGGAGCGGCAGCATCTGCTGGTACTGGATCCGGCAGCCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACTTCTGCTACAGCGGCGCCACCTTCTACACCCCCA GCCTGCGGGGCCGGCTGACCATCAGCGTGGACGCCAGCAAGAACCAGCTGAGCCTGAGCCTGA GCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGCGGGCCGGCGAGAACAGC GGCGGCATCGAGCCCTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGC AGC
NI-101.13 (SEQ ID NO:13)	CAGGTACAGCTGCAGGAGTCAGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTCTCTTCG
NI-101.12F 6A (SEQ ID NO:38)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC TGTGCAGCGTCTGGATTCGCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCA AGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAACTAAAAAATACTATACAGACTCCGTG AAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACACCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATAGGGGTATAGGAGCTCGGCGGGG GCCGTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
NI-101.13A (SEQ ID NO:52)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
NI-101.13B (SEQ ID NO:53)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGAAGAAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGTCCCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGAGTGGAAGTATCCATTATAGCGGGAGCACCTACTACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCTGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAACTGAGCTC TGTTACCGCCGCAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGATCACGTTGGGGCAGCAGCTGGGTA TTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG

Tabla 6: Secuencias del polinucleótido de la región V_L de los anticuerpos específicos de neoepitopo

Anticuerpo	Secuencia de cadena ligera variable (kappa o lambda)
NI-101.10 y NI-101.11 (SEQ ID NO:7)	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCC TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACT GTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTAC G
NI-101.12 (SEQ ID NO:11)	GACGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCATCGGCGACCGGGTGACC ATCACCTGCCGGGCCAGCGAGAGCATCAACAAGTACGTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCA AGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGCCCCCAGCCGGGTGA GCGGCAGCGGCTTCGGCCGGGACTTCAGCCTGACCATCAGCGGCCTGCAGGCCGAGGACTTCG GCGCCTACTTCTGCCAGCAGAGCTACAGCGCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGA GATCAAGCGGACC
NI-101.13 (SEQ ID NO:15)	CAGAGCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGCGAGCGGCACCCCGGGCCAGCGCGTGACCATTAGC TGCAGCGGCAGCAGCAGCAACATTGGCAGCAACTATGTGTATTGGTATCAGCAGCCGCCGGGCA CCGCGCCGAAACTGCTGATTTATCGCAACAACCAGCGCCCGAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAG CGGCAGCAAAAGCGGCACCAGCGCGAGCCTGGCGATTAGCGGCCTGCGCAGCGAAGATGAAGC GGATTATTATTGCGCGGCGTGGGATGATAGCCTGAGCGGCTATGTGTTTGGCACCGGCACCAAA GTGACCGTGCTG
NI-101.12F6A (SEQ ID NO:40)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTCAGCAGAGTTACAGTACCCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT
NI-101.13A (SEQ ID NO:54)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGT GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTAC TGTCAACAGAGTTACAGTACCAGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG
NI-101.13B (SEQ ID NO:55)	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGATTCCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTA CTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCGAACGTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTA CG

A este respecto, la persona experimentada en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o solamente una. Similarmente, los polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o pueden controlarse separadamente para la expresión. Los elementos reguladores posibles permiten la

expresión en células hospederas procarióticas que comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en E. coli, y ejemplos para los elementos reguladores que permiten la expresión en células hospederas eucarióticas son el promotor AOX1 o GAL1 en lavadura o el promotor CMV, SV40, RSV, aumentador CMV, potenciador SV40 o un intrón de globina en células mamíferas y de otro animal. Además los elementos que son responsables para el inicio de la transcripción tales elementos reguladores también pueden comprender señales de termino de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, en dirección descendente del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado por las secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimiento celular o de secretar en el medio pueden agregar a la secuencia codificada del polinucleótido de la invención y son bien conocidos en la técnica. Las secuencias líder se ensamblan en fase apropiada con secuencias de traducción, inicio y término, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una proteína de la misma, en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga pude codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación de la terminal C o N impartiendo características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, los vectores de expresión adecuados se conocen en el arte tales como pcDV1 del vector de expresión de cADN Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcADN 1, pcADN 3 (Invitrogen), o pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferiblemente, las secuencias de

control de expresión serán sistemas promotoras eucarióticas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospederas eucarióticas, pero también se pueden usar secuencias de control para hospederos procarióticos. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedero apropiado, el hospedero se mantiene bajo condiciones adecuadas para la expresión de nivel alto de las secuencias de nucleótido, y, como se desea, pueden seguir la recolección y purificación de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos enlazados u otras formas de inmunoglobulina; ver, Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979).

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en cualquier otra parte. Adicionalmente los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab, y otros derivados, como se describe en la presente, también se contemplan por la invención.

Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar por cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótido del anticuerpo se conoce, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)), que, brevemente, involucra la síntesis de los oligonucleótidos traslapados que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, combinado en sus pares base y ligado de aquellos oligonucleótidos, y luego la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede generar del ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula del anticuerpo se conoce, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una colección de cADN del anticuerpo, o una colección de cADN generada de, o ácido nucleico, preferiblemente poli A+ARN, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo de neoantígeno, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por la amplificación PCR usando cebadores sintéticos hibridizables para los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia del gen particular para identificar, por ejemplo, un clon de cADN de una colección de cADN que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR luego pueden clonarse en vectores de clonación duplicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que la secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido correspondiente del anticuerpo, o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivado del mismo se determina, su secuencia de nucleótido se puede manipular usando métodos bien conocidos en el arte para la manipulación de las secuencias de nucleótido, por ejemplo, técnicas de ADN recombinantes, mutagénesis dirigidas sitio, PCR, etc. (ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al.,

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998), que ambas se incorporan para referencia en la presente en sus totalidades), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácido diferentes, por ejemplo para crear substituciones, eliminaciones, e/o inserciones de aminoácido.

V. Expresión de los Polipéptidos de anticuerpos

La presente invención también involucra un método para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes que comprenden células genéticamente preparadas por ingeniería con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células obtenidas por el método de la invención se pueden usar, por ejemplo, para probar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan típicamente en un vector de expresión para la introducción en células hospederas que se pueden usar para producir la cantidad terapéuticamente efectiva deseada del anticuerpo.

La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que enlaza a una molécula objetivo descrita en la presente. Una vez que un polinucleótido que

codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (preferiblemente que contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera), de la invención se ha obtenido, el vector para la producción de la molécula del anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el arte. De esta manera, los métodos para preparar una proteína al expresar un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica la secuencia de nucleótido se describen en la presente. Los métodos que son bien conocidos para aquellos experimentados en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican el anticuerpo y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. La invención, de esta manera, proporciona vectores duplicables que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica una molécula del anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera los mismos, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, ligados operablemente a un promotor. Tales vectores pueden incluir las secuencias de nucleótido que codifican la región constante de la molécula del anticuerpo (ver, por ejemplo, Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y Patente de E.U.A. No. 5,122,464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en tal vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

La presente invención se refiere a vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en preparaciones por ingeniería

genética que comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno o preferiblemente un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención, que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión y/o una transferencia de gen o vector direccionado. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus de vacuna, virus asociado a adeno, virus del herpes, o virus de papiloma bovino, se puede usar para administración de los polinucleótidos o vector de la invención en la población células direccionadas. Los métodos que son bien conocidos por aquellos experimentados en el arte se pueden usar para construir vectores víricos recombinantes; ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención se pueden reconstituir en liposomas para la administración de células objetivo. Los vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (por ejemplo, dominios variables pesados y/o ligeros de las cadenas de inmunoglobulina que codifican secuencias y secuencias de control de expresión) se pueden transferir en la célula hospedera por métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipoi de hospedero células. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de

calcio o electroporación se puede usar para otros hospederos celulares; ver Sambrook, supra.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en esta patente para referirse al vector usado de acuerdo a la presente invención, como un vehículo para introducirse dentro y expresar un gen deseado en una célula hospedera. Como saben expertos en la materia, tales vectores pueden fácilmente ser seleccionados de un grupo que consiste de: plásmidos, fagos, virus, y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación de un gen deseado y la habilidad de entrar y/o replicarse en células procariotas o eucariotas.

Para el propósito de esta invención, numerosos sistemas de vectores de expresión pueden ser empleados. Por ejemplo, una clase de vectores utilizan elementos de ADN los cuales son derivados de virus de animales tales como virus de papiloma bovino, poliomavirus, adenovirus, virus de vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o el virus SV40. Otros involucran el uso de sistemas policistrónicos con sitios de enlace a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN dentro de sus cromosomas pueden ser seleccionadas mediante la introducción de uno o más marcadores los cuales permitan selección o transfección de células hospederas. El marcador puede proporcionar para la prototrofía para un huésped auxótrofo, resistencia a biocidas (ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador elegido, puede tanto estar directamente ligado a las secuencias de ADN que se expresan, o introducirse dentro de la misma célula por

cotransformación. Elementos adicionales pueden también ser necesarios para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores, y señales de terminación.

En modalidades particularmente preferidas, los genes de región variable clonados son insertados dentro de un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (preferentemente humanos) sintéticos como se describió anteriormente. En una modalidad, esto se realiza usando un vector de expresión propio de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA (descrito en la patente de E.U.A. 6,159,7309). Este vector contiene el potenciador/promotor del citomegalovirus, los principales promotores de beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, exón 1 y exón 2 de neomicina fosfotransferasa, el gen de dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Este vector se ha encontrado para dar lugar a altos niveles de expresión de anticuerpos con la incorporación de genes de las regiones variables y constantes, transfección en células de ovario de hámster chino (CHO), seguido por la selección en medio que contiene G418 y amplificación de metotrexato. Por supuesto, algunos vectores de expresión que pueden provocar su expresión en células eucariotas se pueden usar en la presente invención. Ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no son limitados a plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponible por Invitrogen, San Diego, CA), y plásmidos pCI (disponibles en Promega, Madison, WI). En

general, la selección de un gran número de células transformadas para aquellos que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras es la experimentación rutinaria que pueden llevarse a cabo, por ejemplo, por sistemas robóticos. Sistemas de vectores son también enseñados en las patentes de E.U.A. 5,736,137 y 5,658,570, cada una de las cuales se incorporan como referencia en la totalidad de este documento. Este sistema se proporciona para altos niveles de expresión, por ejemplo, >30 pg/cel/día. Otros sistemas ejemplares de expresión son descritos por ejemplo, en la patente de E.U.A. 6,413,777.

En otras modalidades preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de enlace a antígenos, variantes, o derivados de la invención puede ser expresada usando constructos policistrónicos tales como los divulgados en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003-0157641 A1, presentada en noviembre 18, 2002 e incorporado en la totalidad de este documento. En estos novedosos sistemas de expresión, múltiples productos de genes de interés tales como las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos pueden producirse por un simple constructo policistrónico. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Secuencias (IRES) compatibles son divulgadas en la patente E.U.A.. No. 6,193,980 la cual también se incorpora en esta patente. Los expertos en la materia apreciarán que tales sistemas de expresión pueden ser usados para producir efectivamente toda la gama de anticuerpos divulgados en esta patente.

Más generalizado, una vez que el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo ha sido preparado, el vector de expresión puede ser introducido en una célula hospedera apropiada. La introducción del plásmido en la célula hospedera puede realizarse por diversas técnicas bien conocidas por expertos en la materia. Estas incluyen, pero no se limitan a la transfección (incluyendo la electroporación y electroforesis), la fusión de protoplastos, la precipitación de fosfato de calcio, fusión de célula con cubiertas de ADN, microinyección, y la infección con virus intactos. Ver, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds., Butterworths, Boston, Mass., capítulo 24.2, pp. 470-472 (1988). Normalmente, la introducción del plásmido en el hospedero célula se realiza por medio de la electroporación. Las células hospederas que albergan los constructos de expresión se hacen crecer bajo condiciones apropiadas a la producción de cadenas pesadas y cadenas ligeras, y se ensayan para síntesis de proteínas de cadenas pesadas y/o ligeras. Técnicas ejemplares de ensayo incluyen ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Radioinmunoensayo (RIA), o análisis clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión es transferido a una célula hospedera por técnicas convencionales y las células transfectadas son luego cultivadas por técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso por los métodos descritos en esta patente. Así pues, la invención incluye células hospederas que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena

ligera o pesada de la misma, operablemente unido a promotores heterólogos. En modalidades preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden co-expresarse en células hospederas por expresión de una molécula entera de inmunoglobulina, como se detalla a continuación.

La presente invención además se refiere a las células hospederas transformadas con un polinucleótido o vector de la invención. La célula hospedera puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula hospedera puede tanto ser integrado en el genoma de la célula hospedera o puede mantenerse fuera del cromosoma. La célula hospedera puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tales como, bacteria, insectos, hongos, plantas, animales o células humanas. Las células de hongos preferidas son, por ejemplo, aquellas del género *Saccharomyces*, en particular aquellas de las especies *S. cerevisiae*. El término "procariota" se refiere que incluye a todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con moléculas de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulinas. Los hospederos de procariotas pueden incluir bacterias Gram negativas, así como las Gram positivas como, por ejemplo, *E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariotas" significa que incluye a levaduras, plantas superiores, insectos y preferentemente células de mamíferos, más preferentemente células HEK 293, NSO y CHO. Dependiendo del hospedero empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de

inmunoglobulinas que codifican para los polinucleótidos de la presente invención pueden ser glicosilados o pueden ser no glicosilados. Los anticuerpos de la invención o las correspondientes cadenas de inmunoglobulinas también pueden incluir un residuo de aminoácido inicial de metionina. Un polinucleótido de la invención puede ser utilizado para transformar o transfectar el hospedero usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente normales en la materia. Además, los métodos para la preparación de genes ligados operativamente, fusionados expresándolos en por ejemplo, células animales y bacterianas son bien conocidas en la materia (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Los constructos genéticos y métodos descritos ahí, pueden ser utilizados para expresión del anticuerpo de la invención o las cadenas correspondientes de inmunoglobulina en huéspedes eucariotas o procariotas. En general, los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficiente del polinucleótido insertado, son usados en relación con la célula hospedera. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proveer selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y células hospederas para expresión de inmunoglobulina y secreción pueden obtenerse de diversas fuentes, tales como la American Type Culture Collection ("Catálogo de líneas celulares e hibridomas," Quinta edición (1985) Rockville, Maryland, E.U.A.., que se incorpora en esta patente por referencia). Además, animales transgénicos,

preferentemente mamíferos, que comprenden las células de la invención pueden usarse para la producción a gran escala de los anticuerpos de la invención.

Así, en una nueva modalidad, la presente invención se refiere a un método para la producción de una molécula de enlace específica de proteínas asociada con trastornos, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de enlace o las mismas cadenas de inmunoglobulina, el método comprende.

a) Un cultivo de células como se describió anteriormente

b) Asilamiento del antígeno, molécula de enlace, anticuerpo o fragmento de enlace o las mismas cadenas de inmunoglobulina desde el cultivo.

Las células hospederas transformadas, pueden hacerse crecer en fermentadores y cultivadas de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia para alcanzar el crecimiento óptimo de las células. Una vez expresados, el conjunto de anticuerpos, sus dímeros, cadenas individuales ligeras y pesadas u otras formas de inmunoglobulinas de la presente invención, pueden ser purificadas de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y otros similares; ver, Scopes, "Protein purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o sus correspondientes cadena(s) de inmunoglobulina de la invención pueden ser aislados desde el medio de crecimiento, lisados celulares, o fracciones de membranas celulares. El aislamiento y purificación de por ejemplo, los anticuerpos recombinantes expresados o cadenas de inmunoglobulina de la invención puede

ser por cualquier medio convencional tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como las que involucran el uso de anticuerpos dirigidos monoclonales o policlonales, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que los anticuerpos de la invención pueden ser además acoplados a otras porciones para, por ejemplo, aplicaciones de direccionamiento de fármacos y aplicaciones de imagenología. Tal acoplamiento puede ser conducido químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno al sitio de enlace o el producto acoplado puede ser preparado por ingeniería dentro del anticuerpo o antígeno de la invención a nivel de ADN. Los ADNs son luego expresados en un sistema hospedero adecuado, y las proteínas expresadas son recolectadas y renaturalizadas, si es necesario.

Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de como mínimo alrededor de 90 a 95% de homogeneidad, y se prefieren aun más de 98 a 99% de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o a una homogeneidad deseada, los anticuerpos pueden ser utilizados terapéuticamente (incluyendo extracorporalmente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

La célula hospedera puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica a un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codificando a un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener idénticos marcadores de selección que permiten igualdad de expresión de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un

simple vector puede ser utilizado para codificar a ambos polipéptidos de cadenas ligeras y pesadas. En tales situaciones, las cadenas ligeras son ventajosamente puestas antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadenas pesadas libres tóxicas. (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); kohler, Proc, Natl. Acad. Sci. E.U.A.. 77:2197 (1980)). Las secuencias de codificación para las cadenas ligeras y pesadas pueden comprender ADN genómico o ADNc.

Como se usa en esta patente, "células hospederas" se refiere a las células que albergan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifiquen al menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos para aislamiento de anticuerpos desde huéspedes recombinantes, Los términos "célula" y "cultivo celular" son usados indistintamente para designar la fuente de anticuerpos a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido desde las "células" puede significar tanto girar y asentar el conjunto de células o desde el cultivo celular conteniendo tanto el medio como la suspensión de células.

Una variedad de sistemas de vectores de expresión-huésped pueden ser utilizados para expresar moléculas de anticuerpos para uso en los métodos descritos en esta patente. Tales sistemas de expresión-huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificadas de interés pueden ser producidas y posteriormente purificadas, pero también representan células que pueden, cuando son transformadas o transfectadas con la secuencias codificantes de nucleótidos, expresar una molécula de anticuerpo de la invención en situ. Estos incluyen, pero no se limitan a los

microorganismos como las bacterias (por ejemplo, *E. coli, B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cósmido, vectores de expresión conteniendo secuencias que codifican anticuerpos; levaduras (ejemplo, *Saccharomyces, Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinante de levadura conteniendo secuencias que codifican anticuerpos; sistemas de célula de insecto infectado con vectores de expresión de virus recombinante (ejemplo, baculovirus), conteniendo secuencias que codifican anticuerpos, sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión recombinante de virus (ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión recombinante de plásmidos (ejemplo, plásmido TI) conteniendo secuencias que codifican anticuerpos, o sistemas de células animales (ejemplo, COS, CHO, BLK, 293), células 3T3) que alojan constructos de expresión recombinantes conteniendo promotores derivados del genoma de células animales (ejemplo promotores de metalotioneina) o desde virus animales (ejemplo, el promotor final adenovirus, el promotor vacuna virus 7.5K). Preferentemente, las células bacterianas tales como *Escherichia coli* y más preferentemente células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula completa de anticuerpo recombinante, son utilizadas para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunción con un vector tal como elemento promotor del gen temprano intermediario mayor a partir del citomegalovirus humano es un sistema efectivo de expresión para anticuerpos (Foecking *et al.*, Gene 45:101

(1986) Cockett *et al.*, Bio/Technology 8:2 (1990)).

La línea celular huésped utilizada para expresión de proteínas es a menudo de origen animal; los expertos en la materia están capacitados con habilidad para determinar preferentemente líneas particulares de células hospederas que se adaptan mejor para el producto génico deseado para ser expresado aquí. Ejemplares líneas de células hospederas incluyen, pero no están limitadas a, CHO (Ovario de Hámster Chino), DG44 y DUXB11 (Líneas de Ovario de Hámster Chino, menos DHFR), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T SV49), VERY, BHK (Riñón de hámster bebe), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3 T3 (Fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), p3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Son especialmente preferidas las células CHO. Líneas de células hospederas están típicamente disponibles en los servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivo de Tejidos o de literatura publicada.

Además, una cepa de célula hospedera puede ser elegida la cual modula la expresión de la secuencia insertada, o modifica y procesa el producto génico en la manera específica deseada. Tales modificaciones (ejemplo, glicosilación) y tratamiento (ejemplo, la escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospederas tienen características y mecanismos específicos para el proceso post-traduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse las líneas celulares apropiadas o sistemas

hospederos para garantizar la correcta modificación y transformación de la proteína extracelular expresada. Para este fin, pueden ser usadas las células eucariotas hospederas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la primera transcripción, glicosilación y fosforilación del producto génico.

para producción de alto rendimiento, a largo plazo, se prefiere expresión estable de proteínas recombinantes. Por ejemplo, pueden ser producidas por ingeniería las líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación viral, las células hospederas pueden ser transformadas con ADN controlado por los elementos de control de expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN exógeno, las células producidas por ingeniería pueden permitir un crecimiento por 1-2 días en un medio enriquecido y después se pasa a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar establemente el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede ser utilizado ventajosamente a líneas de células modificadas que expresan establemente la molécula de anticuerpo.

Se pueden utilizar diversos sistemas de selección, incluyendo pero no limitado a los virus del herpes simplex con timidina quinasa (Wigler *et al.* Cell 11:223 (1977), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska &

Szybalsky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (19992)) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:817 1989) los genes pueden ser empleados en células-tk, -hgprt- o -aprt respectivamente. También, la resistencia antimetabolitos puede ser utilizada como la base de selección para los genes siguientes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:572-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5): 155-215 (May, 1993); e Hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984). Métodos comúnmente conocidos en el arte de la tecnología de ADN recombinante que pueden ser utilizados son descritos en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981), que son incorporados por referencia en este documento en su totalidad.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden ser incrementados por amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, *The use of*

vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)). Cuando un marcador en un sistema de vector que expresa anticuerpos es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor presente en un cultivo de célula hospedera, incrementará el número de copias de el gen marcado. Dado que la región de amplificación está asociada con el gen de anticuerpo, la producción de anticuerpo también aumentará (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

La producción *in vitro* permite escalarse para dar grandes cantidades del polipéptido deseado. Técnicas para cultivo de células animales bajo condiciones de cultivo de tejido son conocidas en la materia e incluyen cultivo de suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor elevado con aire o en un reactor continuo de tanque agitado, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microesferas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos pueden ser purificadas por los métodos cromatográficos habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio-iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o (inmuno-) cromatografía de afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis de una región de polipéptido o antes o después del paso de la cromatografía HIC descrito en esta patente.

Genes que codifican anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, sus variantes, o sus derivados de la invención pueden también ser expresados en células no animales tales como bacteria o insecto o levadura o células vegetales.

294

Bacterias que rápidamente toman ácidos nucleicos incluyendo miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella; Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis; Neumococos; Streptococus*, e *Haemofilus influenza*. Se puede apreciar luego que, cuando se expresan en las bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente pasan a formar parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben ser aislados, purificados y luego reunidos en la molécula funcional. Cuando son deseadas formas de anticuerpos tetravalentes, las subunidades se auto ensamblan en anticuerpos tetravalentes (WO02/096948A2).

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede ser ventajosamente seleccionados, dependiendo del uso destinado para la molécula de anticuerpo que se expresó. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de esa proteína se produce, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión o altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, a los vectores de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al., EMBO J.* 2:1791 1983)), en el cual la secuencia codificada de anticuerpo puede ser ligada individualmente en el vector en el marco con la región que codifica para lacZ por lo tanto se produce la proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5504-5509 (1989)); y similares. Los vectores pGEX pueden también ser utilizados para expresar polipéptidos extracelulares como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de

fusión son solubles y pueden ser fácilmente purificadas con lisis celular por adsorción y enlace a una matriz de esferas de glutatión-agarosa seguida por elución en la presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o factor Xa proteasa de sitios de escisión a fin de clonar genes para que el producto génico especifico pueda ser liberado desde los grupos GST.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos también pueden ser utilizados. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el más comúnmente usado entre los microorganismos eucarióticos, aunque un número de otras cepas están comúnmente disponibles, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

Para la expresión en Saccharomyces, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene* 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene* 10:157 (1980)) es utilizado comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la habilidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85:12 (1997)). La presencia de la lesión trpl como una característica del genoma de levadura de la célula hospedera proporciona después un ambiente efectivo para la detección de transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se suele utilizar como vector para expresar genes externos. Los virus crecen en células de *Spodoptera frugiperda*. Los anticuerpos que codifican secuencias pueden ser clonados individualmente en

regiones no esenciales (por ejemplo, el gen poliedro) del virus y puestas bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor poliédrico).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención ha sido recombinantemente expresada, ésta se puede purificar por cualquier método conocido en la materia para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno especifico después de proteína A, y cromatografía de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o por alguna otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Alternativamente, un método preferido para incrementar la afinidad de anticuerpos de la invención es divulgada en la US 2002 0123057 A1.

VI. Proteínas de Fusión y Conjugados

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, dominio que se dice estar unido por enlaces covalentes o no covalentes. La relación puede estar basada en la fusión genética de acuerdo con los métodos conocidos en la materia y descritos anteriormente o puede ser realizado por ejemplo, por reticulado químico como se describe en ejemplo, solicitud internacional WO94/04686. El dominio presente adicional en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención, puede ser preferentemente unido por una ligadura flexible, ventajosamente una ligadura de polipéptido, en donde la ligadura de polipéptido comprende aminoácidos enlazados a péptidos plurales, hidrofílicos, de una longitud suficiente

para abarcar la distancia entre el extremo de terminal C del domino adicional y al terminal Nextremo de terminal N del anticuerpo de la invención o viceversa. El agente activo terapéuticamente o diagnósticamente puede ser acoplado al anticuerpo de la invención o al mismo fragmento de enlace al antígeno por diversos medios. Esto incluye, por ejemplo, proteínas de fusión de cadena sencilla que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención acoplada por métodos covalentes, tales como ligaduras peptídicas, al agente activo terapéutico o diagnóstico. Otros ejemplos incluyen moléculas que constituyen al menos un fragmento de enlace al antígeno junto a moléculas adicionales covalentes o no covalentes incluyendo a aquellas en la siguiente lista ilustrativa no limitada. Traunecker, Int. J. Cancer Surp. SuDP 7 (1992), 51-52, describe el reactivo doble específico janusina en el cual la región Fv dirigida a CD3 es acoplada al CD4 soluble o a otros ligandos como OVCA e IL-7. Del mismo modo, la región variable del anticuerpo de la invención puede ser construida en moléculas FV y junto a ligandos alternativos como aquellos ilustrados en el artículo citado. Higgins, J. Infect Disease 166 (1992), 198-202, describe a un anticuerpo heteroconjugado compuesto de OKT3 reticulado a un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 de gP120. Tales anticuerpos heteroconjugados pueden también ser construidos usando al menos regiones variables contenidas en los métodos del anticuerpo de la invención. Otros ejemplos de anticuerpos específicos incluyen aquellos descritos por Fanger, Cancer Treat. Res. 68 (1993), 181-194 y por Fanger, Crit. Rev. Immunol. 12 (1992), 101-124.

En una modalidad adicional de la presente invención, la

molécula de enlace, el anticuerpo, cadena de inmunoglobulina o el mismo fragmento unido o el antígeno es detectablemente etiquetado. Los agentes de etiquetado pueden estar acoplados tanto directamente como indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto es por uso de una porción espaciadora.

Por lo tanto, la actividad biológica de las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos identificados aquí, sugiere que tienen suficiente afinidad para hacerlos candidatos potenciales para la localización de fármacos a células que expresen la apropiada estructura de la superficie de células y tejidos enfermos respectivamente. Esta dirección y el enlace a células pueden ser útiles para el suministro de agentes activos terapéuticos o de diagnóstico y terapia génica/ suministro de genes. Moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención se enlazarían específicamente a células/tejidos expresando la forma variante de la proteína patológica, y por lo tanto, podrían tener usos terapéuticos y de diagnóstico. Así, la molécula de enlace, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de enlace a antígenos de la presente invención puede ser etiquetado (por ejemplo, fluorescente, radioactivo, enzima, magnética nuclear, metales pesados) y usado para detectar objetivos específicos *in vivo* o *in vitro* incluyendo "inmunoquímica" como ensayos *in vitro*. Pueden ser usados *in vivo* de una manera similar a técnicas de imagenología de medicina nuclear para detectar tejidos, células u otros materiales que expresen el neoepítopo. Así, en una modalidad adicional, la presente invención se refiere al uso de una molécula de enlace o un anticuerpo de la presente invención o al mismo fragmento de enlace para la

preparación de una composición para detección *in vivo* de objetivos terapéuticos y/o agente de diagnóstico para una proteína asociada a trastornos en el cerebro, detectando, suprimiendo la formación de o con la reducción de agregados de proteínas patológicas o las conformaciones en un sujeto, para la mejora de la cognición o frenar o revertir el deterioro cognitivo asociado con enfermedades, o para la extracción extra-corporal de compuestos patológicos o sus precursores desde fluidos corporales.

En ciertas modalidades, el polipéptido de anticuerpos comprende una secuencia de aminoácidos o una o más porciones que no están normalmente asociadas con un anticuerpo. Ejemplares modificaciones son descritas en más detalle a continuación. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de cadena fv de la invención puede comprender una secuencia de ligadura flexible o puede ser modificada para agregar una porción funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina, o algún marcador).

Un polipéptido de anticuerpos de la invención puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de una proteína de fusión. Proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo un dominio de enlace al antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio objetivo de enlace, y al menos una porción heteróloga, por ejemplo, una porción con que no está naturalmente ligado en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos normalmente pueden existir en proteínas separadas que son reunidas en el polipéptido de fusión o pueden normalmente existir en la misma proteína pero son colocadas en una nueva configuración en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden

360

ser creadas, por ejemplo, por síntesis química, o al crear o traducir un polinucleótido en el cual las regiones polipeptídicas están codificadas en la relación que se desee.

El término "heterólogo" aplicado a un polinucleótido o polipéptido, significa que los polinucleótidos o polipéptidos son derivados de una entidad distinta de la del resto de la entidad a la que está siendo comparada. Por ejemplo, como se usa en esta patente, un "polipéptido heterólogo" para ser fusionado a un anticuerpo, o a un fragmentos de enlace al antígeno, variante, o un análogo de la misma, es derivado de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie, o una inmunoglobulina o un polipéptido que no es de inmunoglobulina de una diferente especie.

Como se analiza con más detalle en otra parte de esta patente, los anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden ser fusionados de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en la terminal N o C o químicamente conjugado (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) para polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser recombinantemente unidos o conjugados a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos, o toxinas. Ver, por ejemplo, publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente E.U.A. No. 5,314,995; y EP 396,387.

Los anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de la misma invención pueden ser compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, por ejemplo,

isósteros de péptidos, y pueden contener aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos pueden ser modificados por proceso natural, tales como proceso postraduccional o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la materia. Tales modificaciones están bien descritas en los textos básicos y en las monografías más detallas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier lugar del anticuerpo, incluyendo la columna vertebral del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y las terminaciones amino o carboxi, o en porciones tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en grados variables o iguales en varios sitios en un anticuerpo dado. También, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y ramificados cíclicos pueden resultar del natural proceso postraduccional o pueden ser hechos por métodos sintéticos. Modificaciones incluyen, acetilación, acilación, ribosilación-ADP, amidación, enlaces covalentes de flavina, enlaces covalentes de un grupo hemo, enlaces covalentes de un nucleótido o derivados de nucleótidos, enlaces covalentes de un lípido o derivados de lípidos, enlaces covalentes de fosfotidilinositol, reticulado, ciclización, formación de enlaces de disulfuro, desmetilación, formación de reticulados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación ancla GPI,

hidroxilación, yodación, metilación, miristolación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. (Ver, por ejemplo, Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)).

La presente invención también provee proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, derivados de la misma, y un polipéptido heterólogo. En una modalidad, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera o más de las regiones VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de cualquiera o más de las regiones VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o las mismas variantes, y una secuencia polipeptídica heteróloga. En otra modalidad, una proteína de fusión para uso en el diagnóstico y métodos de tratamiento descritos en esta patente comprenden, consiste esencialmente de, o consiste de un polipéptido teniendo la secuencia de aminoácidos de cualquiera de uno, dos, tres de los VH-CDRs de un anticuerpo, o fragmentos, variantes, derivados de la misma, o cualquier secuencia de aminoácidos, dos, tres de los VL-CDRs de un anticuerpo, o fragmentos,

variantes, derivados de la misma y una secuencia polipeptídica heteróloga. En una modalidad, la proteína de fusión comprende un polipéptido teniendo la secuencia de aminoácidos de un VH-CDR3 de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado o variante de la misma, y una secuencia polipeptídica heteróloga, cuya proteína de fusión se enlaza específicamente al menos a un neoepítopo de una proteína asociada con un trastorno. En otra modalidad, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos una región VH de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes de la misma, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, las regiones VH y VL de la proteína de fusión corresponden a una simple fuente de anticuerpos (o scFV o fragmento Fab) que específicamente se une al menos un neoepítopo de una proteína asociada con el trastorno. En todavía otra modalidad, una proteína de fusión para uso en el diagnóstico y métodos de tratamiento descritos en esta patente, comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de uno, dos, tres o más de VH CDRs de un anticuerpo y secuencia de aminoácidos de cualquiera de uno, dos, tres o más de VL CDRs de un anticuerpo, o fragmentos o variantes de la misma, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferentemente, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de VD-CDR(s) o VL-CDR(s) correspondiente a la única fuente de anticuerpo (o scFv o fragmento Fab) de la invención. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de fusión son también abarcadas por la invención.

304

Las proteínas de fusión ejemplares reportadas en la literatura incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, Proc. *Natl. Acad. Sci. USA.* 84:2936-2940 (1987)), CD4 (Capon *et al.*, Nature 337:525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature* 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell* Biol. USA 9:347-353 (1990); y Byrn *et al.*, *Nature* 344:667-670 (1990)); L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); y Watson *et al.*, *Nature* 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61:1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:561-569 (1991); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66:1133-1144 (1991)); receptor TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 27:2883-2886 (1991); y Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1483-1489 (1991)); y el receptor a de IgE (Ridgway and Gorman, *J. Cell. Biol. Vol. 115*, Abstract No. 1448 (1991)).

Como se discutió en otra parte en esta patente, los anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de la misma de la invención pueden ser fusionados a polipéptidos heterólogos para incrementar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una modalidad, PEG puede estar conjugado a los anticuerpos de la invención para incrementar su vida media *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, Cytokine 16:106 (2001); Adv. In Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); o Weir *et al.*, Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

Además, los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes o derivados de la misma de la invención

pueden ser fusionados a secuencias marcadas, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En modalidades preferidas, la secuencia de aminoácidos marcados es péptido hexa-histidina, tales como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como es descrito en Gentz *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-hisitdina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros péptidos marcados son útiles para la purificación incluyendo pero no limitado a la etiqueta "HA", que corresponde a un epítopo derivado de la proteína de la influenza hemaglutinina (Wilson *et al.,* Cell 37:767 (1984)) y la etiqueta "bandera".

Proteínas de fusión pueden ser preparadas usando métodos que son bien conocidos en la materia (ver por ejemplo patente E.U.A.. Nos. 5,116,964 y 5,225,5238). El sitio preciso en el cual la fusión es hecha puede ser empíricamente seleccionado para optimizar la secreción o características de enlace de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión es luego transfectada en una célula hospedera para su expresión.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en forma no conjugada o puede ser conjugada al menos una de las variedades de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de objetivos, o para obtención de imágenes o terapia de los pacientes. Anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de la misma de la invención puede ser etiquetados o conjugados,

tanto antes o después de la purificación, cuando la purificación se efectúe.

En particular, los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes o derivados de la misma invención pueden ser conjugados a agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, los virus, lípidos, modificadores de respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG.

Los conjugados que son inmunotoxinas incluyendo anticuerpos convencionales han sido ampliamente descritos en la materia. Las toxinas pueden ser acopladas a los anticuerpos por técnicas de acoplamiento convencionales o inmunotoxinas que contienen porciones toxicas de proteína, puede ser producida como proteína de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en una forma correspondiente para obtener tales inmunotoxinas. Ilustrativas de esas inmunotoxinas son aquellas descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Las proteínas de fusión antes descritas podrán además comprender una ligadura de escisión o sitio de escisión para proteínas. Estas porciones espaciadoras, a su vez, pueden ser solubles o insolubles (Dianer *et al.*, Science 231 (1986), 148) y pueden ser seleccionadas para permitir la liberación de fármacos del antígeno en el sitio objetivo. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser acoplados a los anticuerpos y antígenos de la presente invención para inmunoterapia son, fármacos, radioisótopos, lecitinas, y toxinas. Los fármacos con las cuales pueden ser conjugados a los anticuerpos y antígenos de la presente invención incluyen

compuestos que son clásicamente denominadas, fármacos tales como mitomicina C, daunorubicina y vinblastina. En el uso de anticuerpos conjugados radioisotópicamente o antígenos de la invención para por ejemplo, inmunoterapia, ciertos isótopos pueden ser más preferibles que otros dependiendo de tales factores como distribución de leucocitos así como estabilidad y emisión. Dependiendo de la respuesta autoinmunitaria, algunos emisores pueden ser preferidos a otros. En general, los radioisótopos que emiten partículas α y β son preferidos en inmunoterapia. Son preferidos los emisores a de alta energía de corto alcance, tales como ^{212}Bi. Ejemplos de radioisótopos que pueden ser enlazados a los anticuerpos o antígenos de la invención para propósitos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a ^{125}I, ^{131}I, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{64}Cu, ^{212}Bi, ^{212}At, ^{211}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd and ^{188}Re. Otros agentes terapéuticos que pueden ser acoplados a la molécula de enlace. Por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno de la misma invención, así como protocolos terapéuticos *ex vivo* e *in vivo*, son conocidos, o pueden ser fácilmente comprobados, por aquellos de experiencia ordinaria en la materia. Siempre que sea apropiado, la persona experta en la materia puede utilizar un polinucleótido de la invención que codifique cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, antígenos o los vectores correspondientes en lugar de materiales proteínicos en sí mismos.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que los conjugados, también pueden ser ensamblados usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado para ser conjugado. Por ejemplo, conjugados con biotina son preparados por ejemplo, por reacción con un polipéptido de

enlace con un éster activados de biotina tal como el éster de biotina N-hidrosuccinimida. Del mismo modo, conjugados con un marcador fluorescente pueden ser preparados en la presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos enlistados en esta patente, o por reacción con un isotiocianato, preferentemente fluorescein-isotocianato. Conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes, o derivados de la misma invención son preparados de una manera análoga.

La presente invención abarca además anticuerpos, o fragmentos de enlace al antígeno, variantes o derivados de la invención conjugados a un agente terapéutico o de diagnóstico. Los anticuerpos pueden ser usados diagnosticablemente para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de una enfermedad neurológica como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo, determinar la efectividad de un tratamiento dado y/o régimen de prevención. La detección puede ser facilitada por acoplamiento del anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno, variantes o derivados de la misma para una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales que emiten positrones usando tomografías de emisión de varios positrones e iones metálicos no radioactivos paramagnéticos. Ver por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,741,900 para iones metálicos que pueden ser conjugados a anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo a la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasas de raíz de rábano,

fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de adecuados grupo prostéticos complejos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceina diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol, ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y acuorina; y ejemplos de adecuados materiales radiactivos incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{99}Tc.

Un anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno, variante o derivados del mismo también pueden ser detectablemente etiquetados por acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo etiquetado de quimioluminiscencia es luego determinada por detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos etiquetados quimioluminiscentes particularmente útiles son, luminol, isoluminol, ester de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio, y éster de oxalato.

Una de las maneras en que un anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivados del mismo pueden ser detectablemente etiquetados, es por la ligadura de la misma a una enzima y usando el producto de enlace en un inmunoensayo de enzima (EIA) (Voller, A., "Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas" (ELISA, por sus siglas en inglés)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2:1-7 (1978)); Voller *et al., J. Clin. Pathol. 31*:507-520 (1978); Butler, J. E., *Meth.* Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), *Enzyme*

Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.,* (eds.), *Enzyme Immunoassay,* Kgaku Shoin, Tokyo (1981). La enzima que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, de preferencia un sustrato cromogénico, de manera tal de producir una fracción química que puede ser detectada, por ejemplo, por espectrofotometría, fluorometría o por medios visuales. Las enzimas que pueden ser usados para etiquetar de forma detectable al anticuerpo incluyen, pero no se limitan a malato deshidrogenasa, nucleasa de estafilococos, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de raíz de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección se puede lograr por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico de la enzima. La detección puede ser también realizada por comparación visual del alcance de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados similarmente.

La detección también puede ser realizada usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo etiquetado radioactivamente o variante de fragmento de enlace al antígeno, o derivados de la misma, es posible detectar el anticuerpo a través del uso de un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of radioimmunoassays, Seventh Traing Course on Radioligan Assay Techniques,* The Endocrine Society, (March, 1986)), el cual es incorporado por referencia en esta

patente). El isótopo radioactivo puede ser detectado por medio de incluyendo, pero no limitado a un contador de rayos gamma, un contador de escintilación, o autorradiografía.

Un anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno, variante, o derivados de la misma pueden ser también detectablemente etiquetados usando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de la serie de lantánidos. Estos metales se pueden unir a los anticuerpos usando tales grupos de metales quelantes como ácido dietilendiaminotetracético (DTPA) o ácidos etilendiaminotetracético (EDTA).

Las técnicas para la conjugación de diversos grupos para un anticuerpo o fragmento de enlace al antígeno, variantes o derivados de la misma son bien conocidas, ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", En anticuerpos monoclonales y terapia contra el cáncer, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies* '84: *Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982).

312

En determinadas modalidades, una porción que mejora la estabilidad o eficacia de una molécula de enlace, por ejemplo, un polipéptido de enlace, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmunoespecífico de la misma pueden ser conjugados. Por ejemplo, en una modalidad, puede ser conjugado PEG a las moléculas de enlace de la invención para incrementar su vida media *in vivo*. Leong, S.R., *et al.*, *Cytokine 16*:106 (2001); *Adv. in Drug Deliv. Rev. 54*:531 (2002); o Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions 30*:512 (2002).

VII. Composiciones y métodos de uso

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de enlace antes mencionada, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de enlace al antígeno de la presente invención o derivados químicos de la misma, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede además comprender un portador farmacéuticamente aceptable. El término "derivado químico" describe una molécula que contiene grupos químicos adicionales que no son normalmente una parte de la molécula base. Tales grupos pueden mejorar la solubilidad, vida media, absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente las porciones pueden atenuar efectos secundarios indeseables de la molécula base o reducir la toxicidad de la molécula base. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender nuevos agentes tales como interleucinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de

313

Alzheimer, el agente adicional puede ser seleccionado desde el grupo que consiste de moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-Abeta, y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, la presente invención se refiere al uso de las moléculas de enlace, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de los mismos de la presente invención o de moléculas de enlace que tienen sustancialmente la misma especificidad de enlace de cualquiera de los mismos, los polinucleótidos, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento o prevención de la progresión de la enfermedad de Alzheimer; para la mejora de síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer; por diagnóstico o selección de un sujeto para la presencia de enfermedad de Alzheimer o por determinación de un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. La composición farmacéutica puede ser diseñada para administrarse por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral o como aerosol, véase también *infra*.

Por lo tanto, en una modalidad la presente invención, se refiere a un método de tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por acumulación anormal y/o deposición de una proteína en el sistema nervioso central, método que comprende la administración a un sujeto en necesidad de la misma, una efectiva cantidad terapéutica de cualquiera de las moléculas de enlace anteriormente descritas, anticuerpos, antígenos, polinucleótidos, vectores o células de la presente invención. El término "trastorno

neurológico" incluye pero no se limita a la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, demencia fronto-temporal, enfermedad de cuerpos de Lewy, mal de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Binswanger; angiopatía amiloide congofílica, angiopatía amiloide cerebral, síndrome de Down, demencia multi-infarto, enfermedad de Huntington, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, complejo de demencia del SIDA, depresión, trastorno de ansiedad, fobia, parálisis de Bell, epilepsia, encefalitis, esclerosis múltiple, trastornos neuromusculares, trastornos neurológicos, tumores cerebrales, trastorno neurovascular incluyendo accidentes, trastornos neuroinmunológicos, enfermedad neuro-otológica, neurotrauma incluyendo lesiones de la médula espinal, dolor incluyendo el dolor neuropático, trastornos neurológicos pediátricos y neuropsiquiátricos, trastornos del sueño, síndrome de Tourette, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, demencia multi-infarto, fibrosis quística, enfermedad de Gaucher y otros trastornos del movimiento y enfermedades del sistema nervioso central (SNC) en general. A menos que se indique lo contrario, los términos neurodegenerativo, neurológico o neuropsiquiátrico son usados indistintamente en esta patente.

En el sentido de la presente invención, un método es presentado para caracterización de anticuerpos humanos para un gran número de enfermedades y para también producir los anticuerpos subsecuentemente a fin de emplearlos diagnósticamente, terapéuticamente o preventivamente en tales pacientes cuyo sistema inmunitario no reacciona con una correspondiente respuesta inmunitaria para el desarrollo de la patología o de la enfermedad. En particular, esto tendrá

que esperarse en enfermedades ocurriendo en una edad avanzada por que, como se sabe, la reactividad del sistema inmunitario decrece continuamente y significativamente a medida que se incrementa la edad. En estos casos, anticuerpos activos terapéuticamente o preventivamente pueden compensar las restricciones relacionadas con la edad del sistema inmunitario con respecto a bloquear el enriquecimiento de variantes proteicas endógenas patofisiológicas y pueden así contribuir a un mejor estado de salud a una edad avanzada. Así, el uso médico de la presente invención es particularmente aplicable para el grupo de pacientes descritos anteriormente por ejemplo a la edad de 60, 65, 70, 75, 80 o más y en principio se refieren a todas las enfermedades manifestadas por ellos mismos en forma de descarrilamiento de cualquier tipo, como por ejemplo endoproteólisis, alteraciones de la conformación, alteraciones de las modificaciones postraduccionales, mutaciones somáticas o combinaciones de las mismas, fenotípicamente por medio de las variantes de desarrollo de variantes fisiopatológicas de proteínas endógenas. En el sentido de la presente invención, las variantes fisiopatológicas son consideradas, variantes que contienen neoepítopos patológicos que se apartan de la fisiología, véase supra.

En particular, las aplicaciones terapéuticas incluyen enfermedades tumorales, enfermedades inflamatorias y enfermedades del sistema nervioso central, como la enfermedad de Alzheimer, mal de Parkinson, enfermedad de Pick, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedades priónicas incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, parálisis supranuclear

progresiva, atrofia del sistema múltiple, degeneración corticobasal, degeneración frontotemporal con Parkinsonismo unido al cromosoma 17 de la enfermedad de Huntington, demencia frontotemporal, angiopatía amiloide cerebral, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo neerlandés y tipo islandés, ataxia espinocerebelosa y la esclerosis lateral amitrófica así como glaucoma, cuerpos de inclusión miosíticos, polineuropatía amiloide familiar y amiloidosis que comprende proteínas fibrilares derivadas de por lo menos uno de los siguientes precursores proteicos SAA (Proteína-Suero-Amiloide A), AL (k o cadenas l-ligera de inmunoglobulinas), AH (g1 cadenas pesadas-Ig), ATTR (transtiretina, prealbúmina-suero), AApo-A-1 (Apoliproteína A1), AApoA2 (Apoliproteína A2), AGel (Gelsolin), ACys (cistatina C) ALys (lisozima), AFib (Fibrinógeno), Beta-amiloide (proteína amiloide precursora), Beta-amiloide2M (beta2-microglobulina), APrP (proteína priónica), Acal (Procacitonina), AIAPP (islote polipéptido amiloide); Apro (Prolactina), AIns (insulina); AMed (Lactadherina); Aker (querato-epitelina); ALac (Lactoferrina), Abri (AbriPP), ADan (ADanPP); o AANP (péptido auricular natriurético), (Skovronsky *et al.*, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006; 1:151-70; Buxbaum, Curr Opin Rheumatol 2003; 16: 67-75).

Una ventaja particular del enfoque terapéutico de la presente invención reside en el hecho de que los anticuerpos derivados de células B o células de memoria B de un organismo inusualmente estable pre-clínico o clínicamente saludable pueden, con una cierta probabilidad, prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta, o disminuir el riesgo de la

existencia de una enfermedad clínicamente manifiesta, o retrasar el momento de la aparición de una enfermedad clínicamente manifiesta. Normalmente, estos anticuerpos también han pasado ya con éxito a través de la maduración somática, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y efectividad en la alta afinidad de enlace a la molécula de interés por medio de variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento de que tales células *in vivo*, por ejemplo, en un ser humano, no se han activado por medio de otras proteínas fisiológicas, relacionadas o estructuras celulares en el sentido de una reacción alérgica o autoinmunológica es también de gran importancia médica ya que esto significa un considerable aumento de probabilidades de éxito en la vida a través de las fases de pruebas clínicas. Por así decirlo, la eficacia, aceptabilidad y tolerancia ya se han demostrado ante el desarrollo preclínico de los profilácticos o terapéuticos de anticuerpos en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, cabe esperar que, con un procedimiento acorde a la presente invención, tanto el objetivo de la estructura específica de eficiencia de un anticuerpos como el agente terapéutico y su disminución de probabilidad de efectos secundarios, incrementan significativamente sus probabilidades de éxito clínico.

De lo anterior, es evidente que la presente invención comprende cualquier uso de una molécula de enlace específica para la enfermedad que comprende al menos un CDR del anticuerpo antes descrito, en particular para diagnóstico y/o tratamiento de un trastorno relacionado a la enfermedad de Alzheimer y a la deposición Abeta, respectivamente.

Preferiblemente, la molécula de enlace es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Además, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-idiotípicos de cualquiera de los mencionados anticuerpos descritos antes en esta patente. Estos son anticuerpos u otras moléculas de enlace que se unen a la secuencia peptídica única antígena localizada en una región variable de anticuerpo cerca del sitio de enlace al antígeno.

En otra modalidad de la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de las descritas moléculas de enlace antes mencionadas, anticuerpos, fragmentos de enlace al antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y opcionalmente los medios adecuados para la detección tales como los reactivos convencionales usados en métodos de inmunodiagnóstico o basados en ácidos nucleicos. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, situados para uso en inmunoensayos en los que pueden ser utilizadas en fase líquida o unidos a un transportador de fase sólida. Ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son, inmunoensayos competitivos y no competitivos en ya sea de manera directa o indirecta el formato. Ejemplos de tales inmunoensayos son los radioinmunoensayos (RIA), el (ensayo inmunométrico) intercalado, citometría de flujo y la prueba de Western blot. Los antígenos y los anticuerpos de la invención pueden ser enlazados a muchos transportadores diferentes y usados para aislar células específicamente unidas al mismo. Ejemplos bien conocidos de transportadores incluyen el vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon,

amilosas naturales y celulosas modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza de los transportadores puede ser tanto soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Hay muchas etiquetas diferentes y métodos de marcadores conocidos para aquellos ordinarios conocedores de la materia. Ejemplos de los tipos de etiquetas que pueden ser usados en la presente invención incluyen, enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; ver también las modalidades discutidas anteriormente.

Por una modalidad adicional, las moléculas de enlace, en particular anticuerpos de la presente invención pueden también ser usados en un método para el diagnóstico de un trastorno en un individuo para obtener una muestra de fluido corporal desde la prueba individual que puede ser una muestra de sangre, una muestra de linfo o cualquier otra muestra de fluido corporal y poner en contacto la muestras de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El nivel de tales complejos es luego determinado por métodos bien conocidos en la materia, un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra de control indicando la enfermedad en la prueba individual. De la misma manera, también se puede usar el enlace específico al antígeno por los anticuerpos de la invención. Así, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de enlace, por ejemplo, anticuerpo o fragmentos de enlace al antígeno de la misma invención.

En este contexto, la presente invención también se refiere a los medios específicamente diseñados para este

propósito. Por ejemplo, puede ser usada una proteína o matriz anticuerpo-base, que es por ejemplo, ya sea cargada con antígenos derivados desde la proteína asociada con el trastorno mencionada y que contienen el neoepítopo para detectar autoanticuerpos que pueden presentarse en pacientes que sufren desde, por ejemplo, un trastorno neurológico, en particular la enfermedad de Alzheimer o con anticuerpos o moléculas de enlace al antígeno equivalentes de la presente invención que específicamente reconocen cualquiera de esas proteínas. Por ejemplo, la formación de perfiles de micromatrices de antígenos de autoanticuerpos en artritis reumatoide ha sido reportada por Hueber *et al.* Arthritis Rheum. 52 (2005), 2645-2655. Diseño de inmunoensayos de micromatrices se resumen en Kusnezow *et al.*, Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de enlace o antígenos identificados de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también proporciona un empaque o kit farmacéutico y diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, moléculas de enlace, anticuerpos o fragmentos de enlace de los mismos, antígeno, polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Asociada con tales recipiente(s) pueden estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la manufactura, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso el cual refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana. Además o alternativamente el kit comprende reactivos

321

y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición, por ejemplo, kit de la presente invención es por supuesto particularmente adecuada para el diagnóstico, prevención o tratamiento de un trastorno que es acompañado con la presencia de una proteína asociada al trastorno como se definió anteriormente, especialmente amiloidosis y en particular aplicable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD).

Los términos "tratamiento" "el tratamiento de" y similares son usados en esta patente para querer decir generalmente, la obtención de un efecto deseado farmacéutico y/o fisiológico. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de parcial o completamente curativos de una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" que es usado en esta patente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) prevención de que se presente la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero ésta no ha sido diagnosticada que se tenga todavía; (b) inhibir la enfermedad, por ejemplo, la detención de su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocando el retroceso de la enfermedad.

Además, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente humano, en necesidad de tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser formulada de acuerdo a los métodos bien conocidos en la materia, véase por ejemplo Remington: The Science and

Practice of Pharmacy (2000) por la University Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la materia e incluyen soluciones salinas amortiguadas en fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden tales transportadores pueden ser formuladas por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser administradas para el sujeto en una dosis adecuada. La administración de la composición adecuada puede ser realizada por diferentes formas, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones de aerosol tales como formulaciones de rocío nasal incluyen agua purificada u otras soluciones del agente activo con agentes conservadores y agentes isotónicos. Tales formulaciones son preferentemente ajustadas a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Formulaciones para administración por el recto o vagina pueden ser presentadas como un supositorio con un transportador adecuado.

Además, mientras que la presente invención incluye el procedimiento ahora estándar (aunque afortunadamente poco frecuente) de perforación de un pequeño orificio en el cráneo para la administración de un fármaco de la presente invención, en un aspecto preferido, la molécula de enlace, especialmente anticuerpo o fármacos basadas de anticuerpos de la presente invención, pueden atravesar la barrera hematoencefálica, que permite la administración oral o intravenosa.

323

El régimen de dosis será determinado por el médico tratante y factores clínicos. Como es bien conocido en la materia médica, las dosis para cualquiera de los pacientes dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto en particular que se administrará, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otras fármacos suministrados simultáneamente, una dosis típica puede ser, por ejemplo, en el rango de 0.001 a 1000 µg (o de ácidos nucleicos para expresión o para inhibición de expresión en este rango); sin embargo, dosis por debajo o por encima de este rango ejemplar son previstas, especialmente considerando los factores antes mencionados. En general, la dosis puede variar, por ejemplo, de alrededor de 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0,02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) del peso corporal del hospedero. Por ejemplo las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o en el rango de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. Dosis intermedias en los rangos antes mencionados también se intentan que estén dentro del alcance de la invención. A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por el análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración de múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Ejemplares tratamientos adicionales requieren una administración una vez por cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 o 6 meses. Programas de dosis ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg

en días alternos o 60 mg/kg por semana. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes uniones específicas son administrados simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro del rango indicado. El progreso puede ser monitoreado por la evaluación periódica. Preparativos para la administración parental incluyendo soluciones acuosas estériles o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y esteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Transportadores acuosos incluyen agua, soluciones acuosas/alcohólicas, emulsiones o suspensiones, incluyendo salinas y soluciones amortiguadoras. Vehículos parentales incluyendo solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. Conservadores y otros aditivos pueden también ser presentados tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender nuevos agentes tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, en función del uso de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica puede también ser formulada como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-Aβ para inmunización pasiva.

Además, puede ser deseable la coadministración o administración secuencial de otros agentes. Una dosis

terapéutica efectiva o la cantidad que se refiere a aquella cantidad del suficiente ingrediente activo para mejorar los síntomas o condiciones. La eficacia terapéutica y toxicidad de tales compuestos pueden ser determinadas por procedimientos estándares farmacéuticos en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéutica eficaz en el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal al 50% de la población). La relación entre dosis terapéutica y efectos tóxicos es el índice terapéutico, y este puede ser expresado como una relación, LD50/E50. Preferentemente, el agente terapéutico en la composición es presentado en una cantidad suficiente para restaurar el comportamiento normal y/o propiedades cognitivas en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada preferentemente para el tratamiento de trastornos neurológicos incluyendo pero no limitado a la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad priónica incluyendo enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, parálisis supranuclear progresiva, atrofia del sistema múltiple, degeneración corticobasal, degeneración frontotemporal con Parkinson unido al cromosoma 17 enfermedad de Huntington, demencia frontotemporal, angiopatía amiloide cerebral, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Neerlandes y tipo islandés, ataxia espinocerebelosa, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis de Bell, epilepsia, encefalitis, trastornos neuromusculares, glaucoma, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía amiloide familiar,

amiloidosis que comprende proteínas fibrilares derivadas de al menos una de las siguientes proteínas SAA (proteína de suero amiloide A), AL (cadenas ligeras k o l de inmunoglobulinas), AH (cadenas pesadas-Ig g1), ATTR (trastiretina, prealbúmina de suero), AApo-A-1 (Apoliprotina A1), AApoA2 (Apoliproteína A2), Agel (Gelsolina), ACys (Cysteina C), ALys (Lisozima), AFib (fibrinógeno), Beta-amiloide (proteína amiloide precursora), Beta-amiloide2M (beta2-microglobulina), APrP (proteína priónica), ACAL (Procalcitonina), AIAPP (polipéptido islote amiloide); Apro (prolactina), AIns (insulina), AMED (Lactadherina), Aker (kerato-epitelina); ALAC (lactoferrina), Abri (AbriPP), ADan (ADanpp); o AANP (péptido natriuretical auricular), (Skovronsky at al., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006; 1:151-70; Buxbaum, Curr Opin Rheumatol 2003; 16: 67-75, neuro-oncología, neuroinmunología, dolor por neuro-otología, neurología pediátrica, fobia, trastorno afectivo, trastornos del sueño, síndrome de Tourette, otros trastornos del movimiento y enfermedades del sistema nervioso (SNC) en general.

Estas y otras modalidades son divulgadas y abarcadas por la descripción y ejemplos de la presente invención. Más literatura concerniente a cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos para ser utilizada de conformidad con la presente invención puede ser recuperada de librerías públicas y bases de datos, usando por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, la base de datos pública "Medline" puede utilizarse, la cual es organizada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica y/o la Biblioteca Nacional de Medicina en el Instituto Nacional de Salud. Más

bases de datos y direcciones web, tales como las del Instituto Europeo de Biología Molecular (EMBL) son conocidos por los expertos en la materia y pueden también ser obtenidos usando buscadores de internet. Una visión general de la información sobre patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes pertinentes de la información sobre patentes de utilidad para la búsqueda retrospectiva y actual toma de conciencia se da en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La descripción anterior, generalmente describe la presente invención, a menos que se indique lo contrario, un término usado en esta patente es dado con la definición como se dispone en el Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpreso en 2003, ISBN 0 19 850673 2. Varios documentos son citados a través del texto de estas especificaciones. Completas citas bibliográficas pueden encontrarse al final de la especificación inmediatamente después de las reivindicaciones. El contenido de todas las referencias citadas (incluyendo referencias bibliográficas, patentes concedidas, solicitudes de patentes publicadas como citadas a lo largo de esta aplicación y especificaciones de fabricación, instrucciones, etc.) están por eso expresamente incorporados por referencia; sin embargo, no hay admisión de que cualquier documento citado sea, en efecto, arte previo en cuanto a la presente invención.

Una comprensión más completa puede obtenerse por referencia de los siguientes ejemplos específicos que son proporcionados en esta patente para fines sólo de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no deben estar construidos para limitar de ninguna manera el alance de la invención. Descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como aquellos empleados en esta patente pueden ser encontrados en la literatura citada; ver también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" Seventeenth Ed. Ed por Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

En la práctica de la presente invención se emplean, al menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de las habilidades en la materia. Para posterior elaboración de técnicas generales útiles en la práctica de la invención, el médico puede hacer referencia a los libros de texto estándar y de revisiones en biología celular y cultivo de tejido; véase también las referencias citadas en los ejemplos. Métodos generales de la bioquímica molecular y celular, se pueden encontrar en los libros de texto estándar como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volumes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular

329

Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition (Ausubel *et al.*, eds.); and Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.*, eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner *et al.* eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Reactivos equipos, vectores de clonación y kits para manipulación genética que se hacen referencia en esta patente, están disponibles en los proveedores comerciales, tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, y ClonTech. Técnicas generales en cultivo celular y colección de medios son expuestos en gran escala en cultivos celulares de mamíferos (Hu *et al.* Curr. Opin. Biochechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch *et al.*, Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

Los siguientes experimentos se ilustran y describen con respecto a anticuerpos NI-101.11. Sin embargo, los otros anticuerpos de las series NI 101, en particular NI 101.10 son estructuralmente similares y por lo tanto, cabe esperar que proporcionen resultados comparables.

Métodos Suplementarios

Presentación de células de memoria B

Sujetos humanos seleccionados clínicamente con cuidado, quienes se caracterizan por cursos clínicos inusualmente positivos, por ejemplo, ausencia de signos clínicos de enfermedades en la presencia de factores riesgosos, o cursos estables de signos leves o pandrómicos que no desarrollan enfermedades, o de largo plazo no progresores son reclutados para sangre periférica de linfocitos como el material para el aislamiento de células B de memoria. La estrategia se basa en el concepto establecido en la infección inmunológica que el acumulado de células B de memoria de un sujeto conserva la especificidad de anticuerpos y también posiblemente frecuencias de anticuerpos generados durante anteriores encuentros de antígenos (McHeyzer-Williams y Ahmed Curr. Opin Immunol. 11 (1999), 172-179; Bernasconi *et al.*, Science 298 (2002), 2199-202; Traggiai *et al.*, Nat. Med. 10 (2004), 871-875). Este concepto fue desarrollado para explicar la inmunidad adaptativa contra agentes infecciosos, así como para la descripción de inmunidad mediada por anticuerpos después de una infección primaria. De acuerdo a esta teoría, todo el complemento de anticuerpos contra todos los antígenos que han tenido una respuesta de anticuerpos inducida en la historia de sujetos, ya sea de forma natural o en el momento

331

de la vacunación, debe estar plenamente representada con el grupo de células B de memoria. De acuerdo con la presente invención esta teoría es aplicada a antígenos *endógenos* generados como resultado de *agregación anormal* o *conformación* de una o de otra proteína fisiológica relevante y que, como tal, no está sujeta a la tolerancia fisiológica inmunológica, y así, puede adquirir propiedades antígenas e inducir una respuesta inmunitaria contra la conformaciones neo-epítopos (neoepítopos).

Las células de memoria B están aisladas con marcadores de superficie incluyendo el marcador celular pan B CD22, combinados con selección negativa de células B sin experiencia con antígenos que expresan IgM, IgD, IgE, y IgA. Con estas técnicas, aproximadamente 10,000 a 150,000 células B de memoria pueden ser obtenidas desde 30 ml de sangre humana. Estas son inmortalizadas, por ejemplo con Virus de Epstein Barr, y cultivos oligo-clonales sobre capas de un alimentador de fibroblastos humanos irradiados (Zubler *et al.*, J inmunol. 134 (1985), 3662-3668; Traggiai *et al.*, Nat. Med. 10 (2004), 871-875). Para mejorar la transformación e inmortalización efectiva de células de memoria B que secretan los anticuerpos, pueden ser utilizados CpG 2006 que imitan las actividades de dinucleótido-CpG no metilado bacteriano (Hartmann and Kreig J immunol 164 (2) (2000), 944-953).

Protocolo experimental:

La selección de células B de la mayor parte de PBL se realizó usando la tecnología MACS y microperlas CD22 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). PBL fueron etiquetados con MACS antihumano CD22, conjugado de

ficoeritrina antihumano IgD y conjugado-APC anticuerpos antihumanos IgM, IgA, CD3, CD8, CD56 (Becton Dickinson, Basel, Suiza). Células positivas CD22 fueron aisladas usando columnas LS y el dispositivo Midi MACS (Miltenyi) seguido por la selección de células negativas a ficoeritrina y APC usando un clasificador de células MoFlo (Dako, Fort Collins, E.U.A.). Positivo-CD22, IgM-, IgD-, IgA-, y células B negativas a IgE donde fueron incubadas con el virus de Epstein Barr que contiene sobrenadantes obtenidos de células B95-8 y CpG 2006 (Sigma, Buchs, Suiza) en una concentración de 2.5 mg/l en medio de cultivo de células B (RPMI 1640 complementado con suero de ternera fetal al 10% (Hyclone, Perbio, Lausanne, Suiza). 5-50 células fueron sembradas por pozo en placas de fondo redondo Costar de 96 pozos (Corning, Vitaris, Baar, Suiza) en medio de célula B sobre 30,000 PBL humanas irradiadas preparados de donadores voluntarios. Cultivos de células de memoria B se mantuvieron a 37°C y CO_2 al 5 % en un cultivo celular humidificado, incubado por 2-4 semanas tiempo después del cual el medio acondicionado de los cultivos fue ensayado en ELISA y sobre matrices de tejido.

Detección de anticuerpos

Los anticuerpos en medio acondicionado son detectados por el enlace a epítopos patológicos incluyendo agregados proteicos y estructuras anormales patológicas relevantes, en secciones de tejidos obtenidas de pacientes humanos con diagnóstico patológico confirmado, incluyendo pero no restringido a la enfermedad de Alzheimer, u obtenido por sección de tejidos de ratones transgénicos modelo de enfermedades humanas, o por secciones de tejidos obtenidas de

animales modelos de enfermedades humanas incluyendo viejos primates no humanos, o por ELISA de agregados sintéticos de preparados peptídicos. Las estructuras patológicas anoramles en el sentido de la presente invención incluyen, pero no se limitan a placas β-amiloides, ovillos neurofibrilares, agregados alfa-sinucleina en cuerpos de Lewy y agregados de proteína depositados en neuritas distróficas. Tejidos humanos son también usados para excluir reactividades cruzadas de anticuerpos con estructuras de tejido células normales o supercelulares. Los anticuerpos selectos son además analizados por clase y determinación de subclase de cadena ligera. Los mensajes de anticuerpos selectos de relevante patología de cultivos de células de memoria B son transcritos por uso de RT-PCR, clonados y combinados en vectores de expresión para la recombinante producción.

Protocolo experimental:

Detección de células B en medio acondicionado usando micromatrices de tejido compatibles con la microtitulación.

Producción de la matriz

El tejido del cerebro humano alojado en parafina pos-mortem de la enfermedad de Alzheimer fue cortado en rebanadas de 1-2 mm de diámetro y 10 mm de longitud. Cuatro rebanadas fueron sumergidas verticalmente en parafina para formar un montaje cuadrado la microplaca de formato de 9 por 9 mm. 5 µm de rebanadas de tejido fueron cortadas de este montaje con un micrótomo y dos rebanadas fueron montadas adjuntamente unas a otras en las rebanadas de vidrio resultando en un montaje de 2 por 4 barras que forman el formato de microplaca de 96

pozos. Alternativamente, los tejidos de ratones transgénicos APP se utilizaron para preparar la matriz de tejido.

Selección de células B

El medio acondicionado de cultivos de células de memoria B fue transferido en la matriz de tejidos usando una pipeta multicanal e incubando por 2h a temperatura ambiente. Después de un lavado el enlace de anticuerpos humanos a secciones de tejido fue analizado usando anticuerpos secundarios conjugados a Cy 3 para IgC de humano (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, RU). El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio de fluorescencia invertida (Leica, Heerbrug, Suiza).

ELISA

Microplacas de 96 pozos de área a la mitad (Corning) fueron recubiertos con un péptido sintético Abeta a una concentración estándar de 1µg/ml en amortiguador de recubrimiento (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$ pH 9.42) toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas y los sitios de enlace no específicos fueron bloqueados por 1h a temperatura ambiente con PBS que contiene 2% BSA (Sigma, Buchs, Suiza). Las células B en medio acondicionado fueron transferidas desde el plato de cultivo de células B al plato ELISA y se incubaron por 2h a temperatura ambiente. El enlace de anticuerpos humanos se determinó usando anticuerpos policlonales de IgG anti humana de asno conjugada con peroxidasa de raíz de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, RU) seguido por la medición de la actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

335.

Clonación molecular de anticuerpos mostrando la especificidad de interés.

Las células B vivas de cultivos selectos de células de memoria B son recolectadas usando un clasificador de células. El ARNm es preparado y las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina se obtienen usando cebadores específicos de estructura de Ig, para todas las familias de estructura 1 (FR1) variables de cadenas ligeras y pesadas de humanos, como cebadores 5´ en combinación con cebadores específicos para todos los segmentos humanos J-H cebadores 3´ (Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991), 581-597). Alternativamente, la RT-PCR de célula simple para células simples ordenadas del cultivo de células de memoria B pueden ser usadas como fuente de secuencias de cadenas ligeras y pesadas Ig (Babcook *et al.*, Proc, Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996), 7843-7848; Brezinschek *et al.*, J. immunol. 155 (1995), 190-202; Coronella *et al.*, Nucleic Acids Research 28 (2000); Owens, *et al.*, J. immunol. 171 (2003), 2725-2733). La célula simple ordenada conserva el correcto apareamiento de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina de los clones originales de anticuerpos producidos en el cultivo de células B.

La identificación del anticuerpo clonado con la especificidad deseada es realizada por reexaminación en la micromatriz de tejido compatible con microtitulación y ELISA sobre expresión recombinante de los anticuerpos completos. La expresión recombinante de los anticuerpos completos IgG1, se logra sobre inserción de las secuencias de cadenas variables ligeras y pesadas "en el marco de lectura correcto" en

336

vectores de expresión, que complementan la secuencia de región variable con una secuencia que codifica un péptido señal a la terminación 5-prima y la terminación 3´, con una secuencia de codificación de las constantes de dominio(s) apropiadas. Con ese fin, los cebadores contienen sitios de restricción designados para facilitar la clonación de las secuencias de cadenas ligeras y pesadas dentro de vectores de expresión de anticuerpos. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina son expresadas por inserción del producto de RT-PCR de las cadenas pesadas de inmunoglobulina en el marco dentro de un vector de expresión de cadena pesada unido a un péptido de señal y los dominios constantes de inmunoglobulina humana. La cadena ligera Kappa de inmunoglobulina es expresada por inserción del producto de RT-PCR de cadena ligera Kappa en el marco dentro de un vector de expresión de cadena ligera proporcionando un péptido de señal y el dominio constante 1 de cadena ligera de inmunoglobulina de humano. Alternativamente, la inmunoglobulina de cadena ligera lambda es expresada por inserción del producto de RT-PCR de cadena ligera lambda en el marco dentro de un vector de expresión de cadena ligera lambda proporcionando un péptido de señal y el dominio constante 1 de la cadena de inmunoglobulina de cadena ligera lambda de humano.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales son obtenidos con la cotransfección dentro de células HEK 293 (o cualquier otra línea celular recipiente apropiada) de un vector de expresión de cadena pesada Ig y un vector de expresión kappa o lambda de cadena ligera de Ig. El anticuerpo monoclonal humano recombinante es posteriormente purificado desde el medio acondicionado usando una columna de

337

purificación de proteína estándar A. El anticuerpo monoclonal recombinante humano puede ser producido en cantidades ilimitadas usando ya sea células transfectadas estables o transitorias. Las líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales recombinantes pueden establecerse tanto por uso de los vectores de expresión Ig directamente o por re-clonado de regiones variables de Ig dentro de diferentes vectores de expresión. Los derivados tales como F(ab), F(ab)2 y scFv pueden además generarse desde regiones variables de Ig.

Protocolo experimental

RT-PCR de células B a granel

Las células vivas como son identificadas por y sus propiedades de dispersión de la luz lateral y hacia adelante de determinados cultivos de células de memoria B seleccionados, fueron ordenados en alícuotas de 100-2000 células directamente en tubos de 0.2 ml de PCR llenos con 20 µl de ARNlater (Ambion, Huntingdon, RU) usando un clasificador de células MoFlo. El ARNm se preparó usando el kit mRNA-Direct Micro (Dynal, Invitrogen, Basel, Suiza). El ADNc se preparó usando el Kit "RT para PCR" (Clontech BectonDickinson, Basel, Suiza) y PCR de inmunoglobulina (Ig), las secuencias variables de cadena ligera y pesada se realizaron usando el Kit de PCR Advantage 2 (Contech) usando cebadores específicos para todas las familias de variables humanas de cadenas ligeras y pesadas marco de trabajo 1 (FR1) como cebadores 5´en combinación con los cebadores específicos para los dominios constantes de cadena Ig de humano o Kappa Ig o lambda Ig cadenas como cebadores 3´. Los cebadores adquiridos por Microsynth (Balgach, Suiza).

Un péptido de señal que fue usado en todos los vectores de expresión, se derivó de la familia de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana, secuencia 1 L5 (MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRC; SEQ ID NO: 2) como se describe en Base-V y diseñado para proporcionas el sitio de restricción Xba 1 para facilitar el clonado de las regiones variables de la amplificación de PCR.

(ATGGACATGCGGGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCTAGATGC; SEQ ID NO:1). Xbal fue introducido por mutagénesis silenciosa. Como un sitio de restricción en 3´ usado para la clonación de regiones variables de cadena pesada, el sitio de restricción Sal1 fue introducido en C1 de IgG1 proporcionado por el vector. Del mismo modo, el sitio de restricción BsiW1 fue introducido en C1 de la cadena ligera lambda y Xho1 se introdujo en C1 de la cadena ligera lambda. La restricción digerida de productos de PCR y ligación en el vector recipiente se realizó de acuerdo a los procedimientos estándar. El ADN plasmídico se preparó usando Kits estándares (Quiagen, Hombrechtikon, Suiza). Los vectores recipientes contenían un promotor CMV para la expresión de genes de anticuerpos en células de mamíferos.

RT-PCR Unicelular

Para RT-PCR unicelular de las regiones variables de cadena ligera y pesada Ig desde el cultivo de células B, se utilizaron una modificación de los métodos descritos por Owens *et al.* (Owens *et al.*, 2003). Las células simples se depositaron directamente en cada tubo de una serie de tubos de PCR de 2.0 ml usando el clasificador de células MoFlo. Cada tubo fue preparado para contener 10 µl de amortiguadora

RT para transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). Los tubos de PCR fueron congelados en hielo seco y descongelados inmediatamente antes de la RT-PCR. El ADNc fue preparado usando hexámeros al azar (Clontech) y transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). La primera ronda de PCR de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina se realizaron usando, como cebadores 5´, una serie de cebadores que son cebados en todos los péptidos señal conservado entre las familias de regiones variables Ig. En la posición 3´, se usaron los únicos cebadores específicos para la región constante de la cadena pesada C1 Ig o la cadena ligera kappa Ig o lambda Ig. En la segunda ronda el PCR se realizó sobre productos de PCR obtenidos durante la primera ronda de PCR usando los cebadores como se describió para el RT-PCR de células B a granel. En consecuencia se realizó la clonación en vectores recipientes.

Clonación celular alternativa.

La clonación se realizó usando el método de dilución estándar limitada o por deposición unicelular en placas de 96 pozos de cultivo usando un clasificador de células (MoFlo, Dako, Fort Collins, USA). Para la dilución limitada, las células de un cultivo celular de memoria B se recolectaron, pasando a través de una malla de nylon de 30 µm (Falcon, Becton Dickinson, Basel, Suiza) resuspendido en medio y sembradas en placas de 96 pozos o placas de 384 en una concentración de 0.3 células por pozo.

Para la siembra con el clasificador de células, el dispositivo se estableció para depositar una única célula (modo simple 1) por pozo directamente en placas de 96 pozos

340

suplementadas con medio de células B. El medio de cultivo se complementó con medio acondicionado por actividad de las células T. Alternativamente, 30,000 células de alimentación irradiadas se añadieron al medio.

Análisis de secuencias de las secuencias de región variable de inmunoglobulina.

El secuenciamiento de las secuencias de región variable de inmunoglobulina clonada se realizó usando cebadores específicos para el promotor CMV presente 5´ de las secuencias de región variable insertadas Ig en el vector de expresión. Alternativamente, se usaron los cebadores que cebaron en los dominios constantes de cadenas ligeras y pesadas. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas usando el software Vector NTI (Informax-Invitrogen). Se usaron para la expresión los plásmidos que contienen secuencias que codifican para las completas regiones variables de inmunoglobulina en el marco con el péptido líder y el dominio constate.

Expresión de los anticuerpos monoclonales funcionales recombinantes.

Los anticuerpos pueden ser producidos en cantidades suficientes por expresión recombinante usando tecnologías conocidas en la materia. (Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (1995), 553-601). Se produjo el anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 1 mg a la transfección transitoria de células 293 HEK. Se produjo anticuerpo monoclonal humano recombinante de hasta 100 mg a la transducción estable de células 293 HEK o las células

murinas NSO usando vectores lentivirus recombinantes.

Producción a pequeña escala del anticuerpo recombinante humano por transfección transitoria.

El vector de cadena pesada Ig y los vectores de cadena ligera Ig fueron cotransfectados en células 293 HEK usando el método estándar de coprecipitación con fosfato de calcio. Se purificaron anticuerpos recombinantes desde el medio acondicionado por transfección de células 293 HEK usando la columna de purificación de proteínas A (GE-Healthcare, Otelfingen, Suiza).

Producción a gran escala de anticuerpo recombinante humano por transducción estable.

Aquí se empleó un sistema de transfección basado en lentivirus para generar líneas celulares de transducción estable produciendo anticuerpo recombinante humano. (Zufferey *et al.*, J. Virol. 72 (1998), 9873-9880). Las células 293 HEK fueron cotransducidas con dos diferentes lentivectores, uno con un casete de expresión para la cadena pesada de Ig, y el otro, con un casete para la cadena ligera Ig de un anticuerpo recombinante. Este método de transducción puede ser usado en un amplio rango de líneas celulares de mamíferos tales como células CHO y NSO.

Validación en modelos de ratones transgénicos de enfermedades humanas.

Los ratones transgénicos se generaron como se ha descrito anteriormente (Knobloch *et al.*, Neurobiol. Aging July 28 (2006)) sobre unos antecedentes híbridos de C57B1/6 y

342

DBA2. El grupo de prueba fue cruzado una vez a C57B1/6. Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones estándar de alojamiento sobre un ciclo de luz/oscuridad invertido 12 h:12 h y tuvieron acceso libre a los alimentos y agua. Los grupos tratados fueron ponderados por edad (24 meses en la primera prueba, 26 meses en la segunda prueba) y género. Los ratones son tratados con anticuerpos (3 mg/kg de peso corporal) por inyecciones intraperitoneales una vez a la semana sobre un periodo de tiempo de 2 meses, dando como resultado 8 inyecciones por animal.

Pruebas de comportamiento en el laberinto-Y

La tasa de alteración espontánea se evaluó usando un laberinto de plástico en forma de Y, con 40 X 20 X 10 cm de tamaño del brazo. Durante sesiones de 5 min, fueron registradas las secuencias de entradas al brazo; la alternancia fue definida como entradas sucesivas en los tres brazos, en la superposición de conjuntos de triplete. El porcentaje de alteración fue calculado como la relación de alteraciones actuales o posibles. Después de 2 meses de tratamiento con anticuerpos, los ratones son re-analizados en el laberinto-Y. Los investigadores siempre se mantienen ciegos para ambos tratamientos y genotipos durante todo el experimento.

Penetración de la barrera hematoencefálica y enlace a las estructuras anormales en el cerebro.

Para evaluar si los anticuerpos seleccionados o fragmentos de los mismos pueden penetrar la barrera hematoencefálica y se unen a sus agregados anormales o

proteínas objetivos alteradas conformacionalmente en el cerebro, se administra una efectiva dosis de anticuerpo por vía sistémica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intranasal o subcutáneamente a un animal transgénico que se caracteriza por acumulación no fisiológica del agregado o proteína objetivo alterada conformacionalmente en el cerebro. El enlace del anticuerpo a la estructura específica patológica en el cerebro se evalúa luego por inmunotinción con un anticuerpo secundario antihumano Ig etiquetado, seguido por detección inmunohistoquímica estándar.

Protocolo experimental:

Los ratones transgénicos modelo PS-1APPswe para la enfermedad de Alzheimer, recibieron 2 inyecciones periféricas de 150 µg NI-101-11 en el día 1 y día 3. Los ratones fueron sacrificados 24 h después de la segunda inyección y perfusionados con PBS. Los cerebros fueron congelados y las rebanadas de tejidos se prepararon para el congelamiento de tejido usando un criotomo. La presencia de anticuerpo humano sobre secciones de criostato, se ensayaron por tinción con anticuerpo antihumano IgG etiquetado-Cy3 (Jackson InmunoResearch Europe, Suffolk, RU). La localización de plaquetas amiloideas se realizó por cotinción de las secciones de criostato con el anticuerpo control Abeta-específico murino 6E10 (Disponible en Covance, Numero de catalogo SIG-39320) seguido por marcador-FITC anticuerpo IgG antiratón. Alternativamente, se utilizó solo la tinción con anticuerpo IgG anti humano etiquetado-Cy3. El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica)

Reducción de la patología cerebral

Los efectos de tratamientos con anticuerpos en los niveles de agregados o proteínas objetivos alteradas conformacionalmente en el cerebro, se evaluó por tratamiento sistémico o suministro dirigido al cerebro del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo control no relacionado a animales transgénicos con características no fisiológicas de acumulación de los agregados o proteínas objetivo alteradas conformacionalmente en el cerebro. Los efectos de tratamiento son evaluados por inmunotinción o tinción histoquímica de proteínas objetivo agregadas o alteradas y midiendo el área cubierta para tales agregados, tamaño de agregados y número de agregados y cuantificación bioquímica de las concentraciones de las proteínas objetivos en las diferentes áreas del cerebro.

Ausencia de efectos secundarios relacionados con el tratamiento con anticuerpos.

El objetivo potencial relacionado con efectos secundarios del tratamiento con anticuerpos, serán evaluados por administración sistémica o suministro dirigido al cerebro del anticuerpo (intracraneal, intratecal o intraventricular) y un anticuerpo de control no relacionado a animales transgénicos con características no fisiológicas de acumulación de los agregados o proteínas objetivos alteradas conformacionalmente en el cerebro. Efectos potenciales serán evaluados por inmunotinción o tinción histoquímica (por ejemplo, azul de Prusia para microhemorragias, hematoxilina-eosina, glóbulos objetivos activados) y cuantificación

bioquímica (por ejemplo, niveles de citocina por ELISA).

Tinción por Inmunofluorescencia de células vivas

Las células HEK 293 fueron transfectadas transitoriamente con un vector que expresa APP humano de tipo silvestre fusionado al C terminal intracelular a la proteína fluorescente amarilla variante Citrina. 24 horas después de la transfección las células se incubaron con anticuerpos recombinantes humanos o anticuerpos control a 4°C por 30 minutos. Después del paso de lavado las células se fijaron y el anticuerpo enlazado a la superficie se detectó usando anticuerpo secundario etiquetado Cy-3 para humano o ratón IgC (Jackson ImmunoResearch). El análisis de la fluorescencia se realizó en un microscopio confocal (Leica).

Preparación de fibrillas Abeta

El péptido Abeta se adquirió en Bachem (Bubendorf, Suiza). El péptido liofilizado fue reconstituido en TFA y re suspendido en PBS inmediatamente antes de su uso en los ensayos como monomérico Abeta. Las fibrillas Abeta se prepararon por incubación de péptido monomérico Abeta1-42 a una concentración de 100 µg/ml en PBS a 37°C por 24 h. El péptido monomérico Abeta y la preparación fibrilar se realizó utilizando como sustrato para recubrir las placas ELISA.

Western blot

Se mezcló el péptido Abeta monomérico con tinte de carga, desnaturalización por calor y 0.2 µg fueron cargados por carril y separados sobre un gradiente de SDS-PAGE. Las tinciones fueron incubadas con anticuerpo primario por 2 h.

La enlace del anticuerpo monoclonal humano primario o anticuerpo control de ratón 6E10, se reveló usando anticuerpos secundarios antiratón o antihumano conjugados con peroxidasa de raíz de rábano (HRP). Las tinciones fueron desarrolladas usando SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Sustrate (Pierce, Fisher Scientific, Wohlen, Suiza).

Competición de enlace de plaqueta de tejido amiloide

El anticuerpo recombinante humano NI-101.11 se incubó por 2 h con preparaciones de péptido Abeta. Las preparaciones de anticuerpo Abeta se usaron luego para tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro obtenida de un paciente con neuropatología confirmada de la enfermedad de Alzheimer. Fueron preparadas criosecciones de 5 µm, bloqueadas con 4% de BSA, 5% de suero de cabra y 5% de suero de caballo en PBS por 1 h a temperatura ambiente y teñida por 1h a temperatura ambiente con preparaciones de NI-101.11/Abeta. Después del paso de lavado se analizó el enlace de anticuerpo humano a las secciones de tejidos utilizando anticuerpos secundarios conjugados Cy3 para humano IgC (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). El análisis de fluorescencia se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica, Heerbrugg, Suiza).

Ejemplo 1

Detección de Anticuerpos Humanos contra Estructuras Anormales Prevalentes en Enfermedades del Cerebro Humano.

Se probaron los anticuerpos de sujetos saludables fenotípicamente o pacientes inusualmente estables clínicamente con la enfermedad de Alzheimer por

347

inmunohistoquímica, sobre secciones del cerebro obtenidas de pacientes con enfermedad de Alzheimer confirmada patológicamente. La Fig. 1A, demuestra la presencia de anticuerpos en un paciente inusualmente estable clínicamente, que se enlazan a las placas beta-amiloides como fue confirmada por co-tinción con un conocido anticuerpo contra beta-amiloide humano (anticuerpo 4G8; Fig. 1B). En la figura 2A, se mostró la presencia en un sujeto humano de anticuerpos a ovillos neurofibrilares en una sección de tejido obtenida de un paciente con la enfermedad de Alzheimer. Este resultado se confirmó por cotinción con un anticuerpo conocido contra tau humano (HT7). La Figura 3A revela la presencia en un sujeto humano saludable de anticuerpos contra neuritas distróficas, en una sección de tejido obtenida de un paciente con la enfermedad de Alzheimer. En la Figura 3B, se representa la tinción de control con un anticuerpo conocido contra tau humano (HT7). Estos resultados, mostraron la presencia de anticuerpos en pacientes fenotípicamente saludables o inusualmente estables clínicamente contra estructuras patológicas identificables en muestras de tejido humano con diagnóstico confirmado histopatológicamente.

Ejemplo 2

Anticuerpos Recombinantes Humanos Mantienen Especificidad para Estructuras Anormales *in vivo* y Reconocen al Epítopo conformacional de la Proteína Beta-Amiloide Asociada con Enfermedad en Placas Amiloides en el Cerebro, pero no a los Precursores fisiológicos o no Patógenos Derivados de la misma.

Se obtuvieron anticuerpos NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13A y NI-101-13B de pacientes enfermos con Alzheimer

348

clínicamente e inusualmente estables con una velocidad de reducción significativa de deterioro cognitivo. El aislamiento de anticuerpos y producción recombinante se realizó tal como se especifica en los métodos complementarios.

NI-101.11

El recombinante NI-101.11 fue probado para enlace a las placas beta amiloide del cerebro (Fig. 4). Secciones de cerebro obtenidas de un paciente con la enfermedad de Alzheimer confirmada neuropatológicamente, se tiñó a las concentraciones indicadas. La enlace del anticuerpo a las placas beta amiloide con concentraciones de 50 pM, sugieren una alta afinidad de enlace. La enlace de anticuerpo NI-101.11 a placas beta amiloide a una concentración de 0.5 nM, no se pudo completar por adición de cantidades en exceso del polipéptido derivado de Abeta en al terminal N sintético, representando posiciones 1 a 16 a concentraciones de arriba de 1 µM (Fig. 5). Además, la enlace de NI-101.11 a placas beta amiloide sobre secciones de cerebro a 8 nM de concentración, es competida por cantidades en exceso de fibrillas Abeta 1-42 (4 µM) pero no de monómeros lineales sintéticos Abeta 1-42 a concentración de 4 µM, sugiriendo que NI-101.11 reconoce un epítopo de conformación que no está presente en el monomérico Abeta (Fig. 6).

A fin de evaluar el enlace del anticuerpo recombinante humano NI-101.11 al Abeta monomérico sintético lineal, fueron separadas preparaciones de monomérico Abeta por PAGE no desnaturalizado. La proteína teñida fue probada con anticuerpo recombinante humano NI-101.11 y un anticuerpo de

control contra secuencias lineales en Abeta N-terminal (6E10). Aunque 6E10 produjo tinción predominante del péptido monomérico Abeta, no se detectaron enlaces para humano NI-101.11 sugiriendo que NI-101.11 no enlaza al péptido lineal monomérico Abeta pero reconoce a un epítopo conformacional Abeta. (Fig. 7)

El enlace de recombinante NI-101.11 a fibrillas amiloide artificiales desde péptidos sintéticos Abeta1-42 y monomérico Abeta fue determinado por ELISA (Fig. 8). Las fibras sintéticas Abeta o Abeta monomérico sintético revestido en placas de ELISA en iguales densidades de revestimiento, fueron incubadas con NI-101.11 en las concentraciones indicadas. El enlace a fibrillas amiloideas artificiales (cuadrados abiertos) es más que 100 veces mayor en comparación a Abeta monomérico (cuadros llenos). El anticuerpo de control 22C4 contra el C-terminal de Abeta preferentemente enlaza a Abeta monomérico (círculos llenos), y menos bien a fibrillas (círculos abiertos). Esto sugiere que NI-101.10 reconoce una conformación de epítopo que está también presente en fibrillas amiloides artificiales preparadas desde péptidos sintéticos Abeta.

La reactividad cruzada del anticuerpo recombinante humano NI-101.11 contra células de larga duración APP o con cualquiera de estos derivados fisiológicos se determinó por ensayos de enlace celular (Fig. 9).

Células vivas HEK 293 expresando establemente APP humanos fusionado a Citrina como un marcador fueron incubados por 30 min a 4°C, para prevenir internalización, con el anticuerpo recombinante humano NI-101.11 o el anticuerpo de control 6E10 contra la secuencia Abeta lineal N-terminal. Las

señales positivas de citrina indican células que expresan APP. En contraste al anticuerpo control (6E10) que se une a la superficie celular APP en todas las células que expresan la construcción de la fusión, no se detectó el enlace de anticuerpo humano recombinante NI-101.11 a APP de larga duración. Estos datos demostraron ausencia de reactividad cruzada de NI-101.11 a APP fisiológico, celular.

Se demostró además la carencia de enlace de NI-101.11 a Abeta monomérico por cromatografía de tamaño de exclusión: no se observó enlace a NI-101.11 o un anticuerpo de control no relacionado a Abeta1-42 monomérico FITC-etiquetado (Fig. 10A, 10B). En contraste, el anticuerpo 22C4 dirigido contra un epítopo lineal presente en el C terminal de Abeta co-eluido con monómero FITC-Abeta1-42.

En una prueba ELISA de competencia, el enlace de 6E10, un anticuerpo dirigido contra un epítopo lineal en al terminal N de Abeta, puede ser completamente bloqueado sobre preincubación con concentraciones en exceso de Abeta1-16 monomérico, los péptidos Abeta1-28 y Abeta1-40. En contraste, la preincubación con concentraciones en exceso de péptidos lineales Abeta no abolió el enlace NI-101.11, lo que sugiere que NI-101.11 requiere un epítopo conformacional (Fig.11).

NI-101.13A Y 13B

Los anticuerpos recombinantes humanos NI-101.13A y 13B fueron probados para enlace a secciones del cerebro obtenidas desde un APP de un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer (Tg2576). Los recombinantes NI-101.13A y NI-101.13B produjeron tinción predominante de placas beta-amiloide a una concentración de 10 nM (Fig. 12).

El enlace del recombinante NI-101.13A y NI-101.13B a fibrilla amiloide artificial preparada desde el péptido sintético Abeta1-42 y Abeta monomérico fue determinado por ELISA. Fibrillas Abeta sintéticas o Abeta sintético monomérico, revestido en placas de ELISA a densidades iguales de revestimiento, fueron incubadas con NI-101.13A y NI-101.13B en las concentraciones indicadas. Se observó enlace preferencial a fibrillas amiloides artificiales en comparación al Abeta monomérico por ambas pruebas de anticuerpos. (Fig. 13).

NI-101.12

El enlace del recombinante NI-101.12 al péptido sintético Abeta1-42 se confirmo por ELISA (Fig. 14A). El enlace de NI-101.12 a una concentración de 133 nM, se completo por exceso de péptido Abeta1-42 (Fig. 14B)

Ejemplo 3

El Anticuerpo recombinante humano contra Beta-Amiloide cerebral cruza la barrera hematoencefálica en un modelo de ratón transgénico con enfermedad de Alzheimer, y se une a placas cerebrales Beta-Amiloides *in vivo*.

Para determinar si el anticuerpo recombinante humano NI-101.11 cruza la barrera hematoencefálica y se une a placas del cerebro beta-amiloide *in vivo*, ratones transgénicos PS-1/APPswe del modelo con la enfermedad de Alzheimer, recibieron dos inyecciones periféricas de 150 µg de NI-101.11 en el día 1 y día 3. Los ratones fueron sacrificados 24 h después de la segunda inyección y perfusionados con PBS. Los cerebros fueron recolectados y secciones de cerebro fueron teñidas con anticuerpos FITC-etiquetados contra IgG humano o

352

con el anticuerpo Abeta 6E10 monoclonal de ratón, seguido por un anticuerpo FITC-etiquetado contra ratón IgG para confirmar la presencia de placas beta-amiloides. La tinción intensa de placas amiloides con IgG antihumano, indicó que el anticuerpo recombinante humano NI-101.11 puede cruzar la barrera hematoencefálica de ratón transgénico y unirse a las placas del cerebro beta-amiloide en animales vivos. (Fig. 15).

Ejemplo 4

El Anticuerpo Recombinante Humano contra Beta-Amiloide, Mejora el Comportamiento Anormal y Confiere Reducción de la Carga de Placa Beta-Amiloide, Astrogliosis y Microgliosis en un Modelo de Ratón Transgénico con la Enfermedad de Alzheimer sin Incremento en la Frecuencia de Microhemorragias.

Ratones de 24 meses de edad arcAbeta y camadas de tipo silvestre que coinciden en la edad, fueron tratados semanalmente i.p., con 3 mg/kg de anticuerpo recombinante humano NI-101.11 o un anticuerpo de control humano que coincide con el isotipo por 2 meses. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre comportamiento anormal en los ratones transgénicos, se realizaron pruebas del comportamiento del laberinto Y antes y después de la finalización del tratamiento. La tasa de alteración espontánea se evaluó usando un laberinto de plástico en forma de Y, con tamaño de brazos de 40 X 20 X 10 cm. Durante sesiones de 5 min, se registraron la secuencia de entrada a los brazos; la alternancia se definió como entradas sucesivas en los tres brazos, en la superposición de conjuntos de tripletes. El porcentaje de alteración fue calculado como la relación de alteraciones actuales a posibles (definido como el número

total de entradas al brazo -2) multiplicado por 100%. El desempeño del laberinto-Y de ratones no tratados arcAbeta y controles tipo silvestre de la misma camada, se compararon usando una prueba-t impar. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, se usó para comparar la mejora después del tratamiento en todos los cuatro grupos. Se eligió la prueba no paramétrica Mann-Whitney U para comparación de los pares de los diferentes grupos. Los que se desempeñaron en cero (por ejemplo, ratones que no dejaron el brazo fueron colocados en el) fueron excluidos del análisis.

Como se observó en estudios anteriores, ratones sin tratar arcAbeta de 24 meses de edad fueron perjudicados significativamente comparado con sus camadas de tipo silvestre (Fig. 16A, antes del tratamiento; prueba-t impar, p=0.0007).

Ratones arcAbeta tratados con NI-101.11, mostraron claramente mejoramiento en los niveles de alteración, comparado con ratones de control de tipo silvestre tratados con NI-101.11 después de 2 meses de tratamiento. El análisis de la mejora (por ejemplo, el rendimiento después del tratamiento menos el rendimiento antes del tratamiento) mostró una diferencia significativa entre los cuatro grupos (Fig. 16B, prueba Kruskal-Wallis; p = 0.03). Un análisis en pares post-hoc entre todos los grupos mostró que ratones tratados con arcAbeta NI-101.11 mejoraron su rendimiento cognitivo significativamente más que los ratones de tipo silvestre (Mann-Whitney U; p= 0.05 NI-101.11 tg Vs. NI-101.11 wt; p= 0.008 NI-101.11 tg Vs control wt). Este grupo de ratones también mostró una fuerte tendencia a la mejora del rendimiento comparado con el grupo de las camadas

transgénicas tratadas con el anticuerpo de control (Mann-Whitney-U; p= 0.08 NI-101.11 tg vs. control tg). Todos los ratones mostraron una mejora del ~10% en la re-prueba, la cual fue probablemente debido al ambiente familiar de la tarea.

Fueron analizados por histoquímica cuantitativa y análisis inmunohistoquímico, los efectos del tratamiento crónico de 2 meses con NI-101.11 sobre carga amiloide, astrogliosis y microgliosis. Para ese fin, los ratones fueron anestesiados después de la finalización de las pruebas de comportamiento y perfusionadas transcardiacamente con PBS. Un hemisferio cerebral se fijó en 4% de para-formaldehido y alojados en parafina. Secciones sagitales de 5 µm fueron cortadas con un Leica RM 2135 (Bannockburn, Illinois). Fueron cuantificadas las placas beta-amiloide cargadas en corteza e hipocampo sobre secciones de cerebro, teñidas con Tioflavina S y rojo Congo de acuerdo al protocolo estándar. Para inmunohistoquímica, se desparafinaron los cortes, se bloquearon con 4% de BSA, 5% suero de cabra y 5% de suero de caballo en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos fueron incubados toda la noche a 4°C usando las diluciones siguientes: anti GFAP (Advanced Immunochemicals) 1:500, anti IBA1 (WAKO) 1:500. Los anticuerpos acoplados al segundo fluoróforo fueron incubados a temperatura ambiente por 2 h. Se utilizaron 2-3 secciones espaciadas 75 µm separadas por cerebro de ratón para cada tinción. Se tomaron 2 imágenes por sección a una magnificación de 10x para análisis de la corteza (región parietal y frontal). Fue tomada toda el área del hipocampo (magnificación 5x cultivada a ROI) para el análisis del hipocampo. El análisis de imagen

automatizada se realizó con el software Image J.

La doble tinción de secciones de cerebro de ratones arcAbeta inmunizados con 6E10 y antihumano IgG, revelaron el enlace de NI-101.11 a depósitos Abeta (Fig. 17, panel izquierdo), indicando que NI-101.11 puede atravesar la barrera hematoencefálica y unirse a placas del cerebro beta-amiloide. No se observó tal enlace de anticuerpo humano a depósitos Abeta en ratones arcAbeta tratados con el anticuerpo de control (Fig. 17 panel izquierdo).

El tratamiento crónico con 3mg/kg de NI-101.11 dio como resultado una reducción significativa de placas amiloide cargadas como fue revelado por la tinción con Tioflavina S y rojo Congo. Esta reducción alcanzó niveles superiores al 50% en la corteza e hipocampo comparado con ratones arcAbeta tratados con el anticuerpo de control (Fig. 18 A, B). Además del área de la placa (Fig. 18 C), también se observaron reducciones significativas para el número de placas (Fig. 18 D) y el promedio de tamaño de placa (Fig. 18 E).

Para probar si el tratamiento crónico con NI-101.11 afecta la respuesta neuro-inflamatoria en ratones arcAbeta, se cuantificaron astrocitos reactivos y microglia después de tinción inmunohistológica. Una reducción en el número de astrocitos reactivos (anti GFAP-tinción) se observó en la corteza de ratones arcAbeta tratados con NI-101.11 comparado con los animales tratados con el anticuerpo de control (Fig. 19A; Mann-Whitney-U; p= 0.047). No se detectaron cambios en el hipocampo. La tinción con un anticuerpo contra un marcador de microglia y macrófagos (anti-Iba1) también revelaron una tendencia estadística hacia la reducción de la inflamación (Fig. 19 B; Mann-Whitney-U; p = 0.075 para ambos corteza e

hipocampo). El decremento en astrocitos y microgliosis está en línea con la carga con reducción beta-amiloide que se observó después del tratamiento NI-101.11.

La inmunoterapia pasiva con ciertos anticuerpos monoclonales dirigidos contra Abeta puede estar asociada con el incremento de la frecuencia de microhemorragias en el cerebro (Pfeifer *et al.*, Science 298 (2002), 1379; Wilcock *et al.*, J Neuroinflammation 1 (2004), 24). Para evaluar los efectos de terapia crónica con NI-101.11, se realizó tinción de azul de Prusia sobre secciones de cerebro de arcAbeta y ratones de tipo silvestre después del tratamiento crónico con NI-101.11. Estas tinciones, revelaron la presencia de hemosiderina, un producto de degradación de hemoglobina y marcador de la microhemorragia anterior (Fig. 20). En ratones arcAbeta envejecidos tratados con un anticuerpo control, la frecuencia de perfiles positivos de azul de Prusia fue significativamente elevada comparada a las camadas de tipo silvestre (Mann-Whitney-U; $p = 0.001$). El tratamiento con NI-101.11 no permitió un incremento al número de microhemorragias cuando es comparado con los ratones arcAbeta tratados con el anticuerpo control (Mann-Whitney-U; $p = 0.347$) indicando que los efectos benéficos terapéuticos de tratamiento con NI-101.11 ocurrieron en la ausencia de estos efectos secundarios frecuentemente observados a inmunoterapia pasiva Abeta.

Ejemplo 5

El Anticuerpo Recombinante Humano contra Beta-Amiloide Cerebral Inhibe la Formación de Fibrillas Sintéticas Abeta *In vitro*.

357

Fue ensayado el efecto del anticuerpo recombinante humano NI-101.11 sobre la formación de fibrillas Abeta mediante la medición de enlace de Tioflavina S a agregados Abeta por análisis de fluorescencia. Soluciones monoméricas Abeta fueron incubadas a 37°C por 24 h en la presencia de falta de incremento en la concentración de NI-101.11. La formación de fibrillas sintéticas Abeta *in vitro* fue inhibida por NI-101.11 humano recombinante en una manera dependiente de la concentración (Fig. 21).

Ejemplo 6

Efectos de NI-101.11 sobre Fagocitosis Ex-vivo de Fibrillas Abeta por células BV-2 derivadas de la Microglia.

Los efectos de NI-101.11 sobre la fagocitosis mediada por el receptor-Fcgamma de fibrillas Abeta, fueron estudiadas en la línea celular BV-2 derivada de la microglia. Las células BC-2 se mantuvieron en DMEM complementados con 5% de FBS, Pen/Strep y glutamina. Las células fueron tratadas con tripsina y 120,000 BV-2 células/pozos fueron sembradas en placas de fondo plano de 24 pozos. Después de 12 h, el medio fue remplazado con 400 µl de DMEM/F12/pozo complementado con 20 mM HEPES (pH 7.3), 1% de BSA, 10 µg/ml Pen/Strep. 10 µg/ml de Fucoidan, un inhibidor del receptor fagocítico, se adicionó 30 minutos antes del experimento. 50 µM de fibrilos Abeta etiquetados con FITC fueron pre incubados con las concentraciones indicadas de anticuerpos por 30 minutos a 37°C, lavado dos veces seguido de centrifugación por 5 min. a 14,000 x g. Esta suspensión se adicionó a las placas de cultivo de tejidos. Después de 30 min las células BV-2 fueron lavadas dos veces con HBSS para remover Abeta fibrilar no

asociado.

Las células fueron tratadas con 250 µg/ml de EDTA/tripsina por 20 min. a 4°C y lavadas dos veces por centrifugación a 500 x g por 5 min. a 4°C. Las células se fijaron por 20 min. en FACS-Fix (PBS, 2%FA, 2% glucosa, 5 mM NaN) y lavadas dos veces con lavado de FACS (PBS, 5 µM de EDTA, 0.2% de BSA). La fluorescencia (FL-1) de 10,000 células se determinó por análisis FACS (basado en Webster SD *et al.* JI 2001).

La fagocitosis dependiente del receptor Fcgamma de fibrillas Abeta1-42 marcadas con FITC se midió sobre la inhibición del sistema receptor fagocítico. El análisis comparativo de NI-101.11 humano y anticuerpo disponible comercialmente dirigido a un epítopo lineal en al terminal N del péptido Abeta (6E10) demostraron inducción dependiente de la dosis de fagocitosis de fibrillas Abeta. La absorción de fibrillas mediada por NI-101.11 es hasta 3 veces superior que la observada para el anticuerpo 6E10 (Fig. 22). Estos datos indican que NI-101.11 desencadena potente fagocitosis mediada por receptor Fcgamma dependiente de la dosis de fibrillas Abeta por microglias.

Conclusión

Como se ha demostrado en los experimentos anteriores realizados de acuerdo con la presente invención, fue sorprendentemente posible detectar anticuerpos activos terapéuticamente y de protección y anticuerpos produciendo células B en sujetos humanos fenotípicamente saludables y asintomáticos, así como, en pacientes con enfermedad clínica inusualmente estable, a pesar de un diagnóstico de deterioro cognitivo o la enfermedad de Alzheimer. Más específicamente,

se detectó y aisló una nueva clase de anticuerpos humanos, que discriminan la forma funcional fisiológica de un antígeno, minimizando así el riesgo de efectos secundarios autoinmunogénicos que hasta ahora han sido un problema en la inmunoterapia. Por lo tanto, se proporcionan los anticuerpos y moléculas de enlace equivalentes, que reconocen específicamente una variante del antígeno en una estructura relevante patofisiológica, en la cual el anticuerpo se supone que se une con el fin de reducir su toxicidad o reducir su concentración o promover su degradación, por medio de, por ejemplo, hacer al patógeno para macrófagos que expresan FcR o células de microglias visibles y por tanto, para que sea inocua. Como se demostró en los ejemplos, tales anticuerpos son efectivos terapéuticamente y son capaces de suspender así como de prevenir efectos nocivos de proteínas patológicamente anormales y agregados de la misma sin incremento en la frecuencia de microhemorragias cerebrales.

360

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una molécula de enlace específico a una proteína asociada con un trastorno, el método caracterizado porque comprende:

(a) someter una muestra obtenida de un paciente que está libre de síntomas pero afectado con un trastorno o en riesgo de desarrollarlo, o un paciente con un curso de enfermedad inusualmente estable a un espécimen de células patológicamente alteradas o tejido de características clínicas predeterminadas; e

(b) identificar y opcionalmente aislar una molécula de enlace que enlaza al espécimen pero no a las correspondientes células o tejidos de un sujeto saludable.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra comprende un fluido corporal o una muestra de células.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el fluido corporal es fluido cerebroespinal, plasma u orina 5.

4. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la molécula de enlace es un anticuerpo.

5. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la muestra comprende células B o células B de memoria o se deriva de ellas.

6. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque paciente y sujeto, respectivamente, son humanos.

361

7. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se ha determinado que el paciente está afectado con un trastorno no manifestado todavía o en riesgo de desarrollar el trastorno por la presencia o ausencia de un marcador sustituto.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el marcador sustituto está seleccionado del grupo que consiste en vejez, carga amiloide cerebral, genotipo ApoE, genotipo APP, genotipo PS1, niveles en fluidos corporales de péptido Abeta, isoprostanos, Tau y fosfo-Tau.

9. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el trastorno está seleccionado del grupo que consiste en trastornos neurológicos, trastornos autoinmunitarios y tumores.

10. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.

11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la muestra se obtiene de un paciente que cumple el siguiente criterio:

(i) tiene 65 años de edad o mayor;

(ii) tiene plena capacidad cognitiva y buena salud; y

(iii) no tiene signos clínicos de demencia; o

(iv) tiene velocidades inusualmente lentas de progresión de la enfermedad a pesar de la presencia de un diagnóstico clínico establecido de probable enfermedad de Alzheimer.

12. El método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado además porque comprende las etapas de:

(i) purificar células B o células de memoria B de una

362

muestra que se ha identificado que contiene moléculas enlazantes, por ejemplo anticuerpos que enlazan al espécimen pero no a las correspondientes células o tejido de un sujeto saludable;

(ii) obtener el repertorio de gen de inmunoglobulina para los anticuerpos a partir de las células B o células de memoria B; y

(iii) usar el repertorio para expresar los anticuerpos.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la etapa (ii) comprende las etapas de

(iv) obtener mARN de las células B o células B de memoria;

(v) obtener cADN del mARN de la etapa (iv); y

(vi) usar una reacción de extensión de cebador para amplificar del cADN los fragmentos que corresponden a las cadenas pesadas (HC) y las cadenas ligeras kappa (LC) de los anticuerpos.

14. Una molécula de enlace obtenida por el método de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque es capaz de reconocer selectivamente un neoepítopo de una proteína asociada con el trastorno.

15. La molécula de enlace de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque no reconoce substancialmente la proteína en su forma no asociada con el trastorno.

16. La molécula de enlace de conformidad con la reivindicación 14 ó 15, caracterizada porque es un anticuerpo o un fragmento del mismo enlazante de antígeno.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque es un anticuerpo humano.

18. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizada porque el trastorno es un trastorno neurológico.

19. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, caracterizada porque el trastorno es un trastorno del cerebro.

20. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, caracterizada porque es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica en el sitio del evento patológico.

21. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, caracterizada porque puede enlazar placas amiloides beta, amiloide cerebrovascular, depósitos Abeta difusos, nudos neurofibrilares, tau hiperfosforilado, cuerpos de Lewy de sinucleina alfa positiva o agregados de proteína asociados con neuritas distróficas.

22. La molécula de enlace de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, caracterizada porque es capaz de restablecer substancialmente el comportamiento normal.

23. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, caracterizada porque se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')2.

24. La molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, caracterizada porque es un anticuerpo o fragmento enlazante del mismo que comprende en su región variable al menos una región

determinante de complementariedad (CDR) como se describe en la Tabla 4.

25. El anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácido de la región VH y/o VL como se describe en las Tablas 2 y 3.

26. Un antígeno caracterizado porque es reconocido por la molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25.

27. El antígeno de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque es al menos parte de una proteína asociada con un trastorno como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

28. Un polinucleótido caracterizado porque codifica la molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 o el antígeno de conformidad con la reivindicación 26 ó 27.

29. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque codifica al menos la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con la reivindicación 24 ó 25.

30. Un vector caracterizado porque comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 o el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 29, opcionalmente en combinación con un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 29 que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo.

31. Una célula hospedera caracterizada porque comprende un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 ó

29 o un vector de conformidad con la reivindicación 30.

32. Un método para preparar una molécula de enlace específico con la proteína asociada con un trastorno, un anticuerpo o un fragmento de enlace o cadenas de inmunoglobulina del mismo, el método caracterizado porque comprende

(a) cultivar la célula de conformidad con la reivindicación 31; y

(b) aislar del cultivo la molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo.

33. Una molécula de enlace, un anticuerpo, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de enlace del mismo, caracterizado porque es codificado por un polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 ó 29 u obtenible por el método de conformidad con la reivindicación 32.

34. La molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33, caracterizada porque es etiquetada de una manera detectable.

35. La molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

36. La molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33 a 35, caracterizada porque se enlaza a un fármaco.

37. Una composición, caracterizada porque comprende la

366

molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33 a 36, el antígeno de conformidad con la reivindicación 26 ó 27, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 o 29, el vector de conformidad con la reivindicación 30 o la célula de conformidad con la reivindicación 31.

38. La composición de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque es una composición farmacéutica y además comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

39. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada además porque comprende un agente adicional útil para tratar la enfermedad de Alzheimer, seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-Abeta y combinaciones de los mismos.

40. La composición de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque es una composición diagnóstica y además comprende reactivos convencionalmente usados en métodos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos o de inmunodiagnóstico.

41. Uso de la molécula de enlace, el anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33 a 36 ó de un anticuerpo que tiene substancialmente las mismas especificidades de enlace de cualquiera de ellos, el antígeno de conformidad con la reivindicación 26 ó 27, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 ó 29, el vector de conformidad con la reivindicación 30 o la célula de conformidad con la reivindicación 31 para la preparación de una composición

367

farmacéutica o diagnóstica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o la prevención de la progresión de esta; para el alivio de síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer; para el diagnóstico o la selección de un sujeto por la presencia de la enfermedad de Alzheimer o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

42. El uso de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque la composición farmacéutica se administra intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intranasalmente, parenteralmente o como un aerosol.

43. Un método para tratar un trastorno neurológico, caracterizado por la acumulación anormal y/o la deposición de una proteína en el sistema nervioso central, donde el método comprende administrar a un sujeto que necesita de la misma una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 o 33 a 36, el antígeno de conformidad con la reivindicación 26 o 27, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 o 29, el vector de conformidad con la reivindicación 30 o la célula de conformidad con la reivindicación 31.

44. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el trastorno es seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, el deterioro cognitivo leve, la angiopatía amiloide cerebral, la demencia vascular, la demencia multi-infarto, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la fibrosis cística o la

enfermedad de Gaucher.

45. El método de conformidad con la reivindicación 43 ó 44, caracterizado porque la administración se realiza intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intranasalmente, parenteralmente o como un aerosol.

46. Un método para diagnóstico y/o tratamiento de un trastorno relacionado con la enfermedad de Alzheimer y la deposición Abeta, respectivamente, caracterizado porque comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula ligando enlazante de Abeta que comprende al menos una CDR del anticuerpo o fragmento de enlace de conformidad con la reivindicación 24 o 25 o un anticuerpo anti-idiotípico correspondiente.

47. Un kit para el diagnóstico de un trastorno acompañado por la presencia de una proteína asociada con el trastorno como se define en cualquiera de los péptidos reivindicados, el kit caracterizado porque comprende la molécula de enlace, el anticuerpo o el fragmento de enlace de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33 a 36, el antígeno de conformidad con la reivindicación 26 ó 27, el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28 ó 29, el vector de conformidad con la reivindicación 30 o la célula de conformidad con la reivindicación 31, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para el uso.

48. El uso de una molécula de enlace, un anticuerpo o un fragmento de enlace del mismo de conformidad con una de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25 ó 33 a 36 para detectar *in vivo* a una proteína asociada con un trastorno en

el cerebro o dirigir a la proteína un agente terapéutico y/o de diagnóstico, detectar, suprimir o reducir la formación de agregados o conformaciones patológicas de proteína en un sujeto, para mejorar la cognición o detener o revertir el deterioro cognitivo asociado con enfermedades o para la extracción extra-corporal de compuestos patológicos o sus precursores de los fluidos corporales.

49. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo enlazante de antígeno, caracterizado porque específicamente se enlazan al mismo neoepítopo de una proteína asociada con un trastorno como lo hace un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A, y NI-101.13B.

50. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo enlazante del antígeno, caracterizado porque el anticuerpo inhibe competitivamente el enlace de un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A y NI-101.13B al neoepítopo de un trastorno asociado.

51. Un anticuerpo aislado o un fragmento del mismo enlazante del antígeno caracterizado porque el anticuerpo comprende un dominio enlazante del antígeno idéntico al de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en NI-101.10, NI-101.11, NI-101.12, NI-101.13, NI-101.12F6A, NI-101.13A y NI-101.13B.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan moléculas de enlace específicas novedosas, particularmente anticuerpos humanos así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos que reconocen neoepítopos de proteínas asociadas con enfermedad que se derivan de proteínas endógenas nativas pero son predominantes en el cuerpo de un paciente en una forma variante y/o fuera de su contexto fisiológico normal. Además, se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden tales moléculas de enlace, anticuerpos y miméticos del mismo y métodos de separación por exclusión para moléculas de enlace novedosas, que pueden o no pueden ser anticuerpos así como objetivos en el tratamiento de trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer.

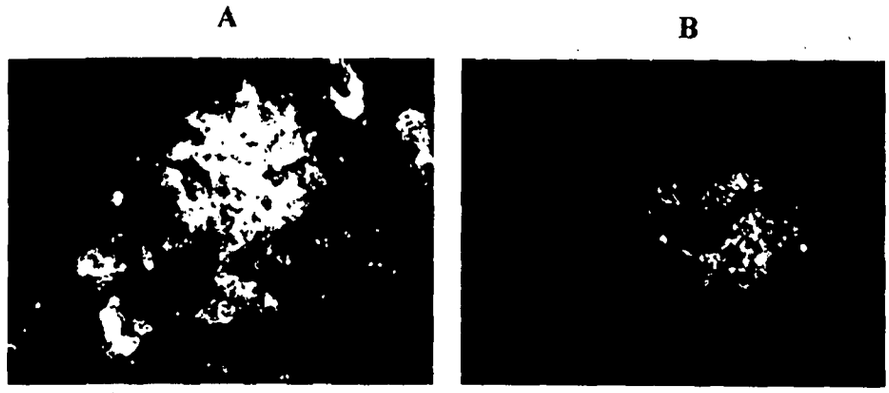


FIG. 1

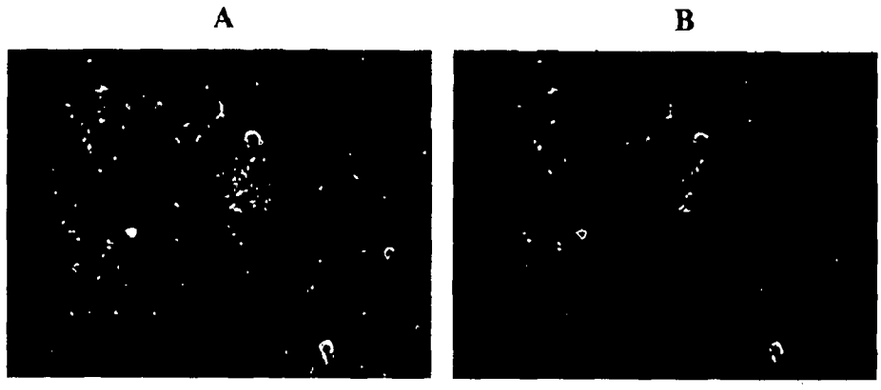


FIG. 2

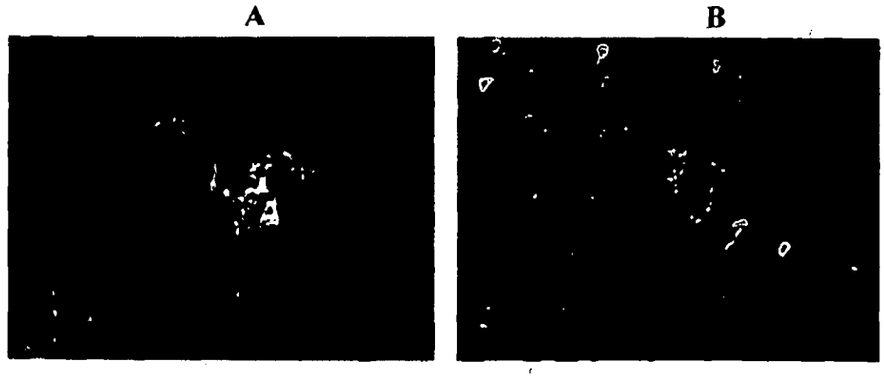


FIG. 3

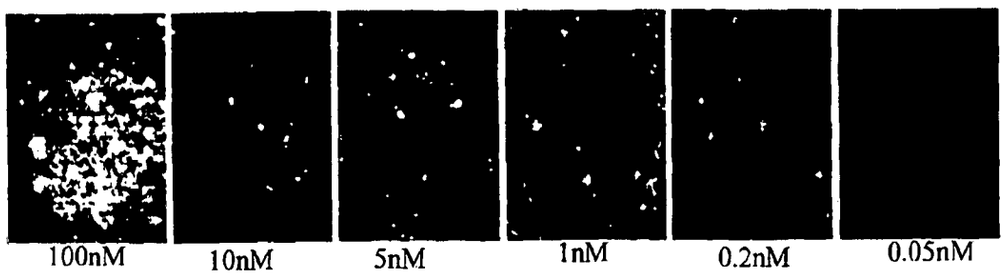


FIG. 4

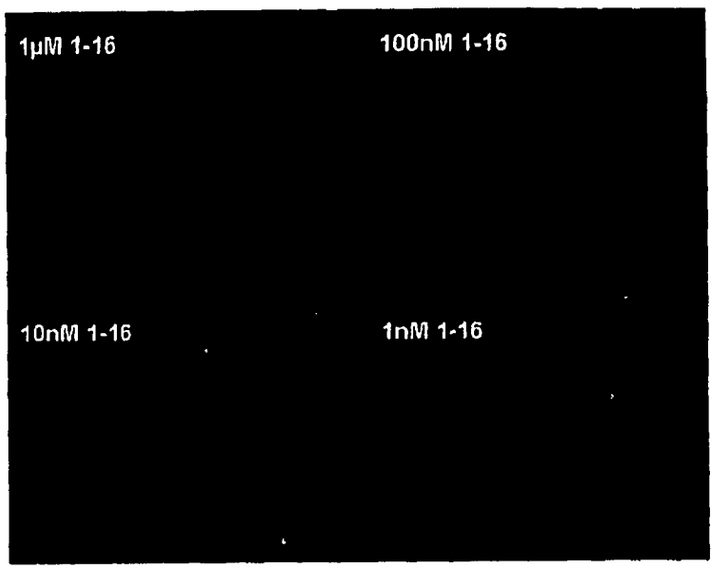


FIG. 5



FIG. 6



NI-101.11 6E10

FIGURA 7

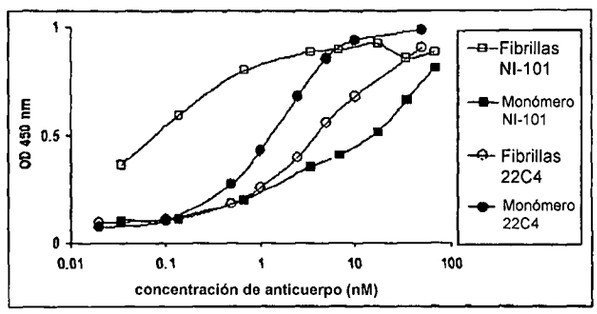


FIG. 8

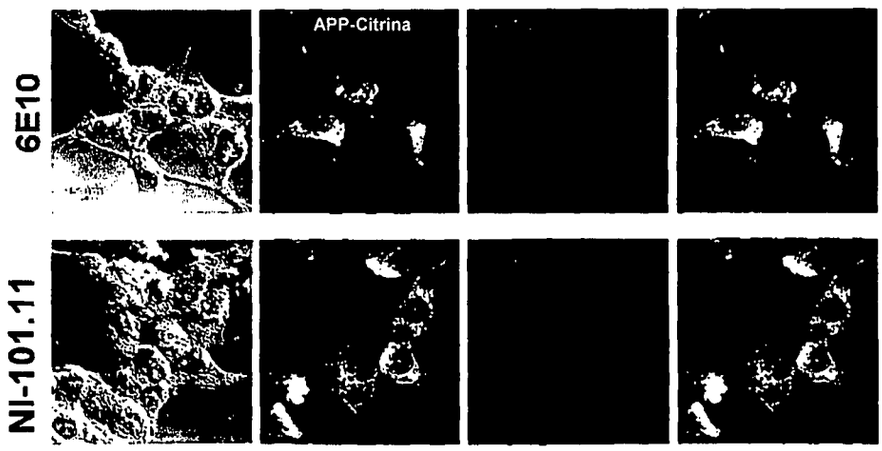
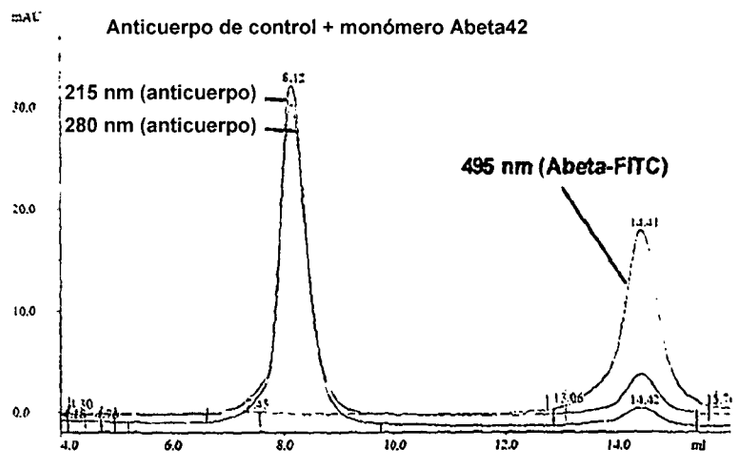
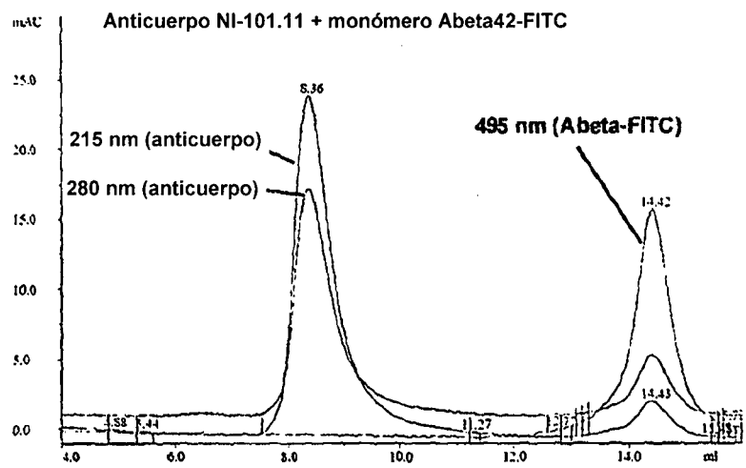


FIG. 9

A


Anticuerpo de control + monómero Abeta42
215 nm (anticuerpo)
280 nm (anticuerpo)
495 nm (Abeta-FITC)
mAU
ml

B


Anticuerpo NI-101.11 + monómero Abeta42-FITC
215 nm (anticuerpo)
280 nm (anticuerpo)
495 nm (Abeta-FITC)
mAU
ml

C

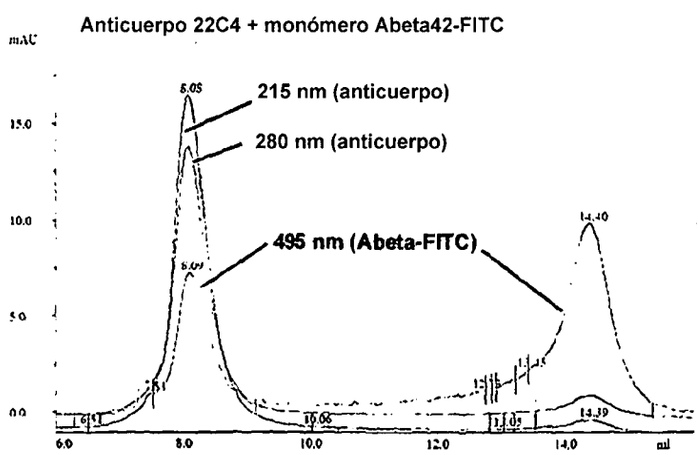

Anticuerpo 22C4 + monómero Abeta42-FITC
215 nm (anticuerpo)
280 nm (anticuerpo)
495 nm (Abeta-FITC)
mAU
ml

FIG. 10A-C

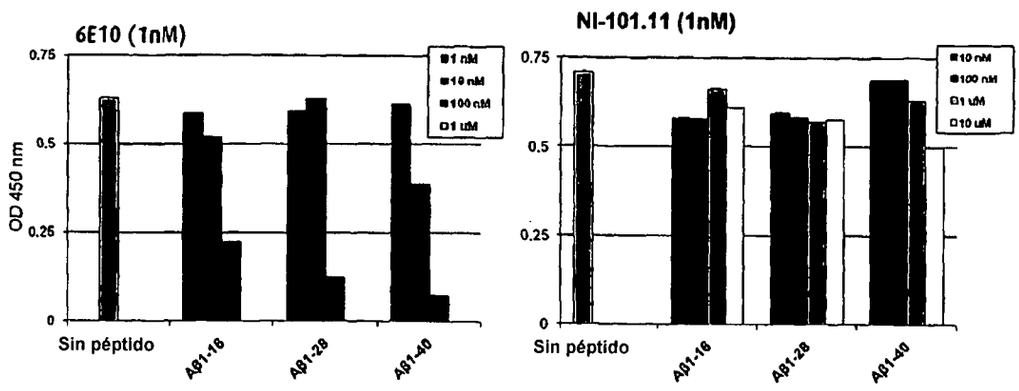


FIG. 11

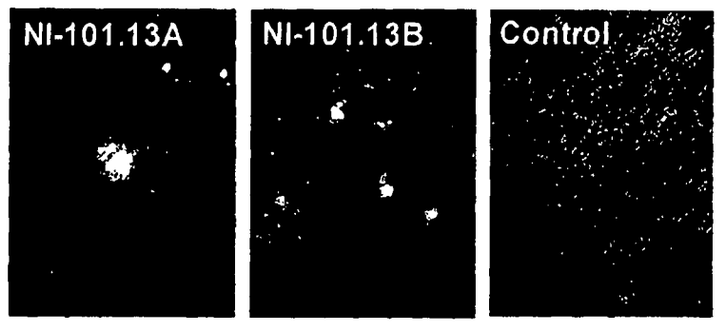


FIG. 12

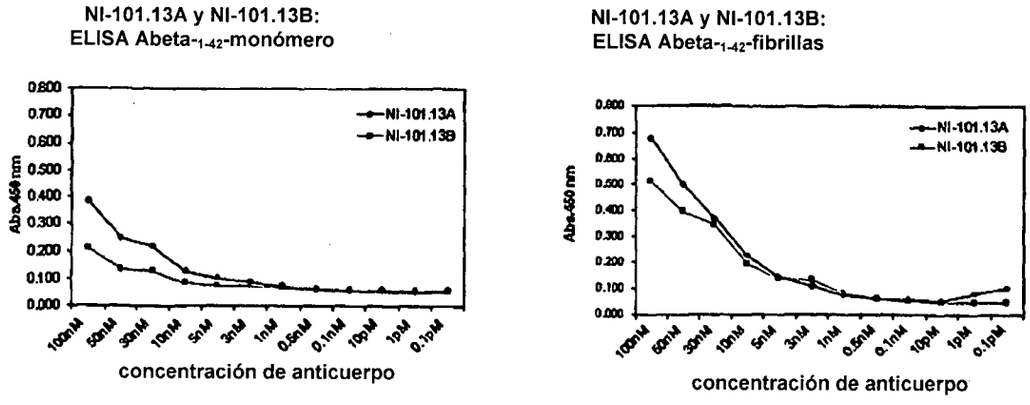


FIG. 13

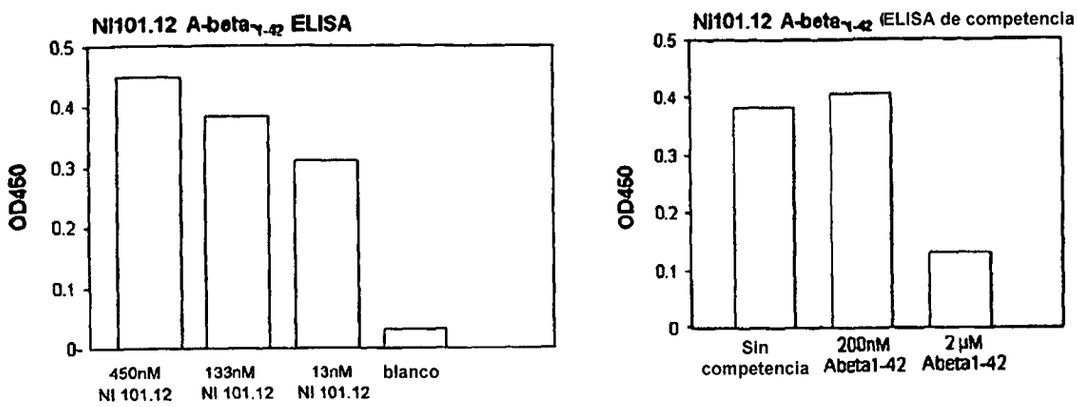


FIG. 14A-B

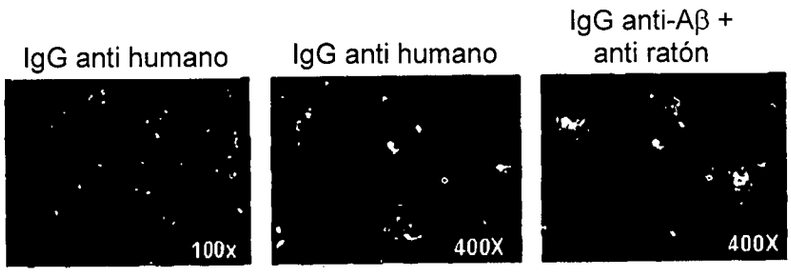


FIG. 15

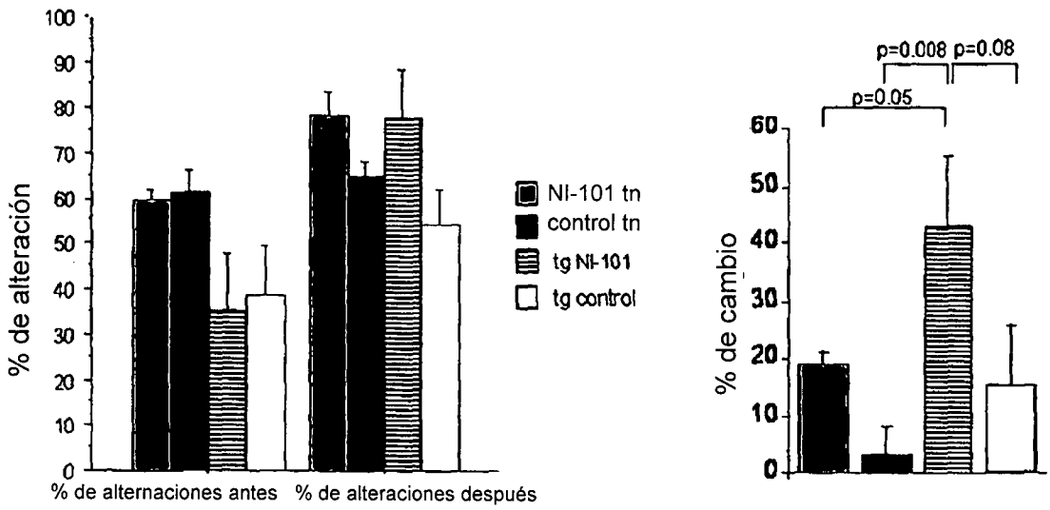


FIG. 16A-B

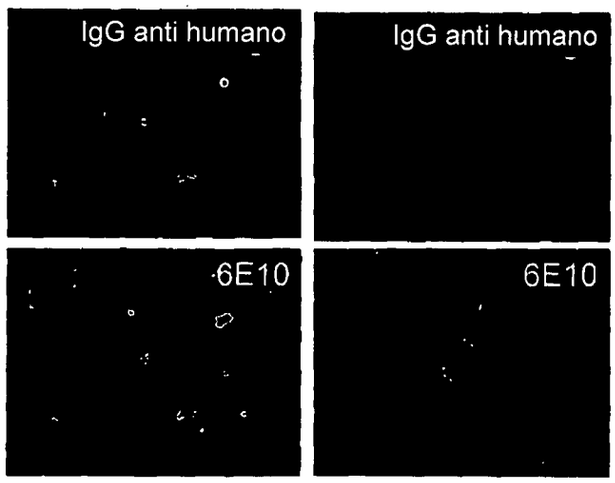


FIG. 17

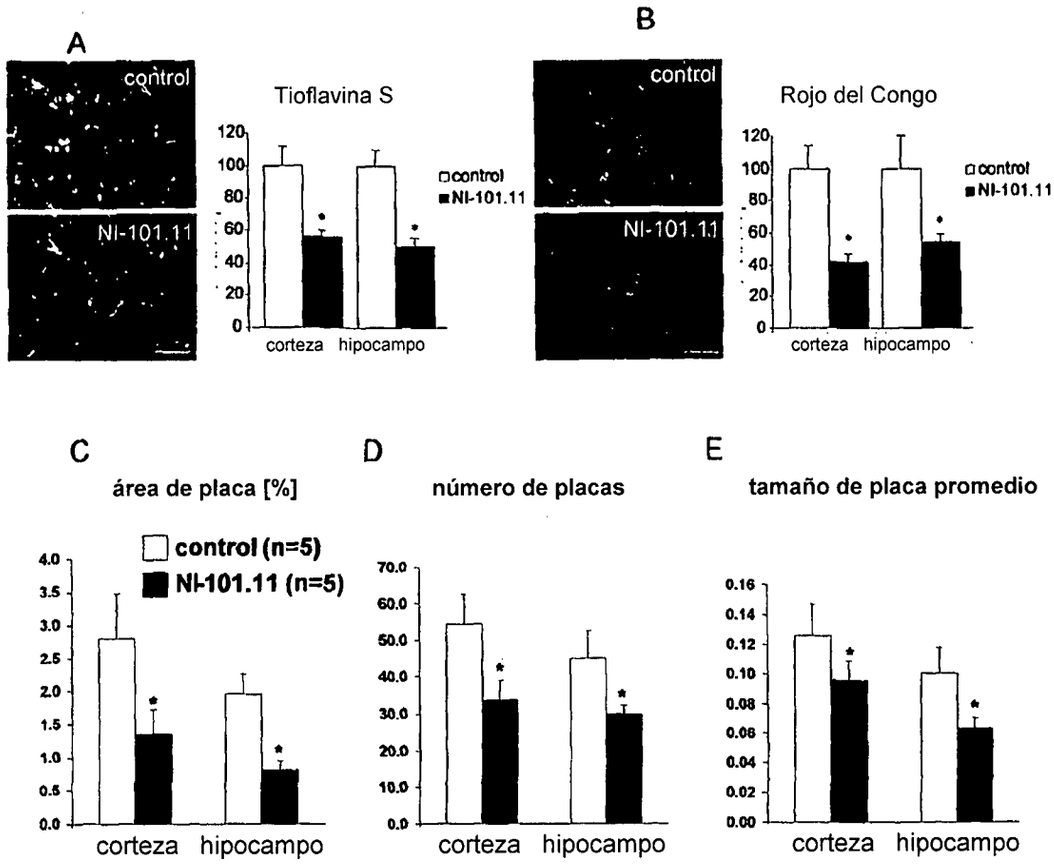


FIG. 18A-E

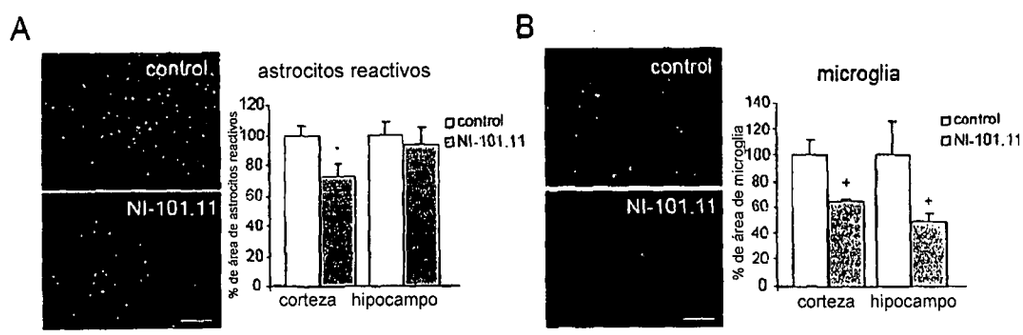


FIG. 19A-B

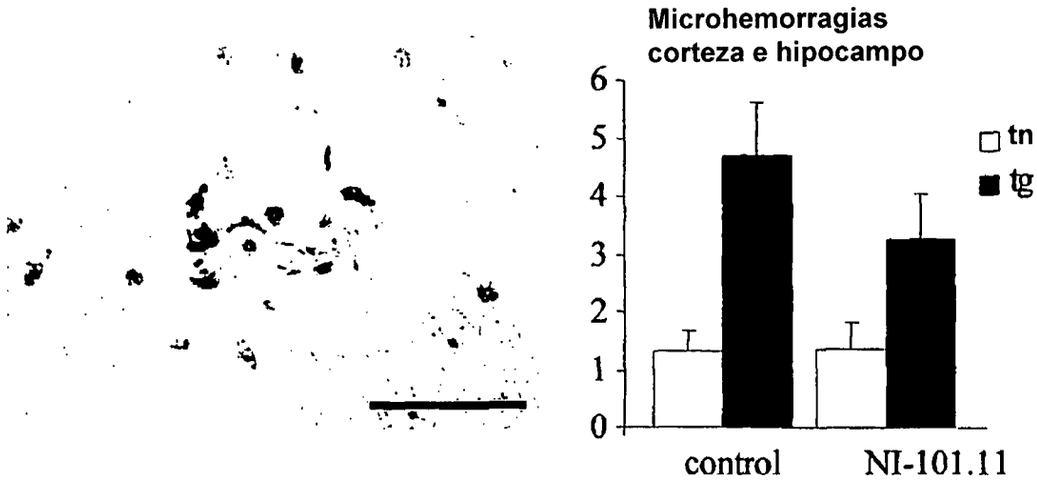

Microhemorragias
corteza e hipocampo
6
5
4
3
2
1
0
tn
tg
control
NI-101.11

FIG. 20

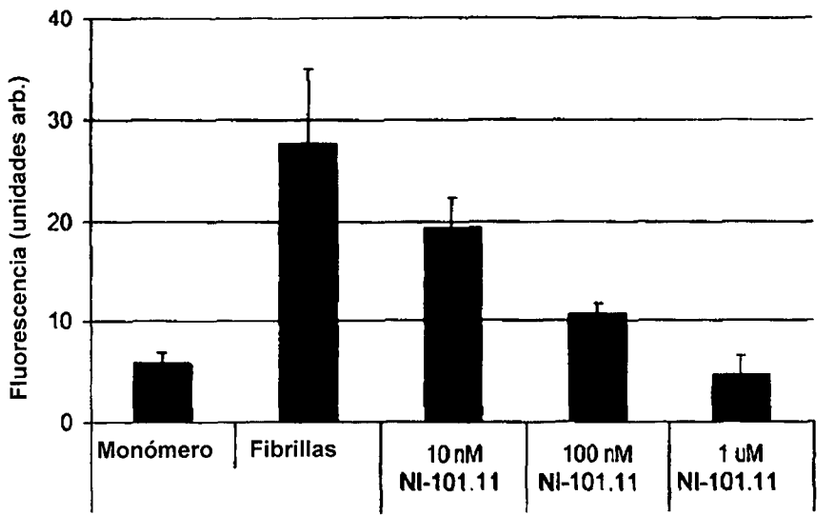

Fluorescencia (unidades arb.)
40
30
20
10
0
Monómero
Fibrillas
10 nM
NI-101.11
100 nM
NI-101.11
1 uM
NI-101.11

FIG. 21

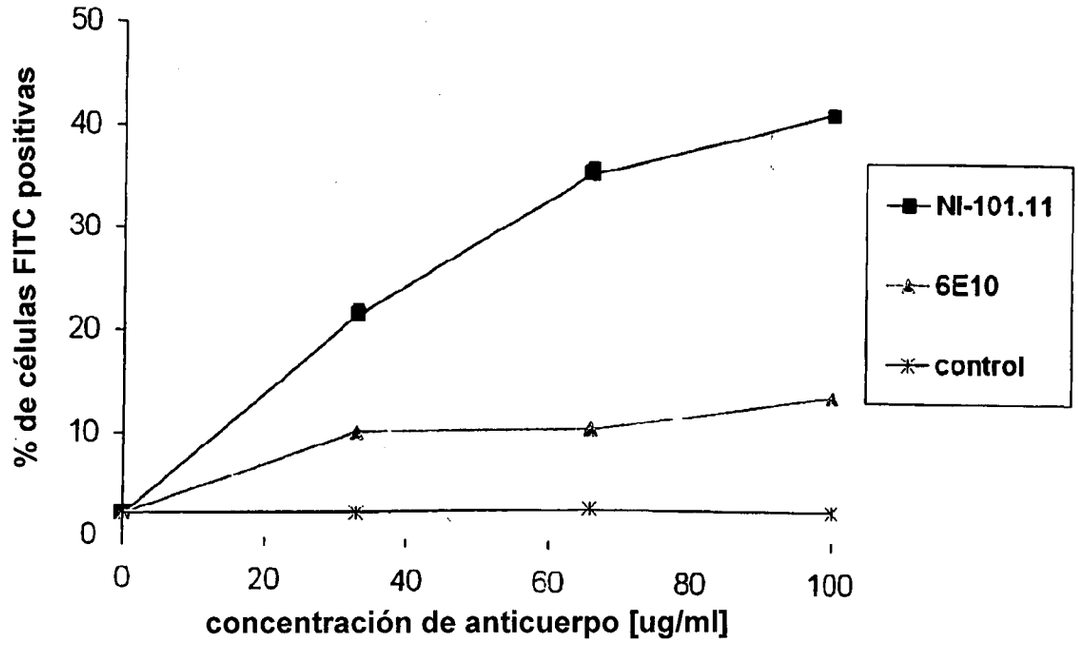

% de células FITC positivas
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
concentración de anticuerpo [ug/ml]
NI-101.11
6E10
control

FIG. 22

381

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of Zurich

<120> MÉTODOS PARA SUMINISTRAR MOLÉCULAS Y OBJETIVOS DE ENLACE ESPECIFICOS DE ENFERMEDADES
<130> NE30A06/P-WO

<160> 56

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 66
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> características diversas
<222> (1)..(66)
<223> Péptido lider derivado de Vkappa I L5 humano, sitio de restricción Xba 1 que introduce 3' de la secuencia

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(66)

<400> 1
atg gac atg cgg gtg ccc gcc cag ctg ctg ggc ctg ctg ctg ctg tgg 48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

ttc ccc ggc tct aga tgc 66
Phe Pro Gly Ser Arg Cys
20

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys
20

<210> 3
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> región V
<222> (1)..(372)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (Vh) NI-101.10

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

382

<400> 3

```
gag gtg cag cta gtg cag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg       48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110
```

583

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 372
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Codón optimizado

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(372)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (Vh) NI-101.11

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 5

```
gag gtg cag ctg gtg cag agc ggc ggc ggc gtg gtg cag ccc ggc cgg       48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

agc ctg cgg ctg agc tgc gcc gcc agc ggc ttc gcc ttc agc agc tac       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc atg cac tgg gtg cgg cag gcc ccc ggc aag ggc ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gcc gtg atc tgg ttc gac ggc acc aag aag tac tac acc gac agc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac acc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc cgg gac cgg ggc atc ggc gcc cgg cgg ggc ccc tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtg tgg ggc aag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 6
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15
```

384

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(327)
<223> Secuencia de cadena ligera kappa variable (Vkappa) NI-101.10 y NI-101-11

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 7
gaa att gtg ctg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc 288

385

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

act ttc ggc gga ggg acc aag ctc gag atc aaa cgt acg 327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 9
<211> 381
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(381)
<223> secuencia de cadena pesada variable (Vh) NI-101.12

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 9
gag gtg cag ctg gtg gag agc ggc ccc ggc ctg gtg aag ccc gcc gag 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15

acc ctg agc ctg acc tgc acc gtg agc ggc ggc agc atc cgg agc ggc 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
20 25 30

agc atc tgc tgg tac tgg atc cgg cag ccc ccc ggc aag ggc ctg gag 144
Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

```
        35                  40                  45

tgg atc ggc tac ttc tgc tac agc ggc gcc acc ttc tac acc ccc agc      192
Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
    50                  55                  60

ctg cgg ggc cgg ctg acc atc agc gtg gac gcc agc aag aac cag ctg      240
Leu Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Ala Ser Lys Asn Gln Leu
65                  70                  75                  80

agc ctg agc ctg agc agc gtg acc gcc gcc gac acc gcc gtg tac tac      288
Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

tgc gcc cgg cgg gcc ggc gag aac agc ggc ggc atc gag ccc tac tac      336
Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
            100                 105                 110

ggc atg gac gtg tgg ggc cag ggc acc acc gtg acc gtg agc agc          381
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 10
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
            20                  25                  30

Ser Ile Cys Trp Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr
            100                 105                 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 11
<211> 330
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>

<221> Región V
<222> (1)..(330)
<223> secuencia de cadena ligera kappa variable (Vkappa) NI-101.12

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<400> 11
gac gag atc gtg ctg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc atc 48
Asp Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile
1 5 10 15

ggc gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gcc agc gag agc atc aac aag 96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
20 25 30

tac gtg aac tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg 144
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tac gcc gcc agc agc ctg cag agc ggc gcc ccc agc cgg gtg agc 192
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
50 55 60

ggc agc ggc ttc ggc cgg gac ttc agc ctg acc atc agc ggc ctg cag 240
Gly Ser Gly Phe Gly Arg Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

gcc gag gac ttc ggc gcc tac ttc tgc cag cag agc tac agc gcc ccc 288
Ala Glu Asp Phe Gly Ala Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
85 90 95
tac acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aag cgg acc 330
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys
20 25 30

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Val Ser
50 55 60

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

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

```
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105                 110


<210>  13
<211>  363
<212>  ADN
<213>  Homo sapiens


<220>
<221>  Región V
<222>  (1)..(363)
<223>  secuencia de cadena pesada variable (Vh) NI-101.13

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(363)

<400>  13
cag gta cag ctg cag gag tca ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag       48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc aga aga       96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
            20                  25                  30

agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag      144
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
        35                  40                  45

tgg agt gga agt atc cat tat agc ggg agc acc tac tac aac ccg tcc      192
Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
    50                  55                  60

ctc aag agt cga gtc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag ttc      240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                  70                  75                  80

tcc ctg aaa ctg agc tct gtt acc gcc gca gac acg gct gtc tat tac      288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

tgt gcg aga tca cgt tgg ggc agc agc tgg gta ttt gac tac tgg ggc      336
Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

cag ggc aca ctg gtc acc gtc tct tcg                                 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  14
<211>  121
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15


Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
            20                  25                  30
```

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 330
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(330)
<223> secuencia de cadena ligera lambda variable (Vlambda) NI-101.13

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(330)

<400> 15
cag agc gtg ctg acc cag ccg ccg agc gcg agc ggc acc ccg ggc cag 48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

cgc gtg acc att agc tgc agc ggc agc agc agc aac att ggc agc aac 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

tat gtg tat tgg tat cag cag ccg ccg ggc acc gcg ccg aaa ctg ctg 144
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

att tat cgc aac aac cag cgc ccg agc ggc gtg ccg gat cgc ttt agc 192
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agc aaa agc ggc acc agc gcg agc ctg gcg att agc ggc ctg cgc 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

agc gaa gat gaa gcg gat tat tat tgc gcg gcg tgg gat gat agc ctg 288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95
agc ggc tat gtg ttt ggc acc ggc acc aaa gtg acc gtg ctg 330
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16
<211> 110

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(5)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR1
<400> 17

Ser Tyr Gly Ile His
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(17)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR2

<400> 18

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(15)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10 Vh, CDR3

<400> 19

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(5)
<223> Denominación de secuencias de proteínas CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh, CDR1

<400> 20

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(17)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh, CDR2

392

<400> 21

Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(15)
<223> Denominación de secuencias de proteínas CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.11 y NI-101.12F6A Vh, CDR3

<400> 22

Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteínas CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A Vkappa, CDR1

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)

393

<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A Vkappa, CDR2

<400> 24

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(9)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.10, NI-101.11 y NI-101.12F6A Vkappa, CDR3

<400> 25

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(5)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR1

<400> 26

Ser Gly Ser Ile Cys
1 5

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(19)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR2

<400> 27

Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser Gly Ala Thr Phe Tyr Thr Pro Ser
1 5 10 15

Leu Arg Gly

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(17)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vh, CDR3

<400> 28

Arg Ala Gly Glu Asn Ser Gly Gly Ile Glu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR1

<400> 29

Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asn Lys Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR2

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(9)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.12 Vkappa, CDR3

<400> 31

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR1

<400> 32

Arg Arg Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(16)

396

<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR2

<400> 33

Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vh, CDR3

<400> 34

Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(13)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR1

<400> 35

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR2

397

<400> 36

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de NI-101.13 Vlambda, CDR3

<400> 37

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 38
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(372)
<223> secuencia de cadena (Vh) pesada de variable NI-101.12F6A

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)

<400> 38

```
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg       48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tat       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg      144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tgg ttt gat gga act aaa aaa tac tat aca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac acc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

398

```
gcg aga gat agg ggt ata gga gct cgg cgg ggg ccg tac tac atg gac      336
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca                      372
Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  39
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15


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


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


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


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


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


Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Arg Arg Gly Pro Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110


Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  40
<211>  324
<212>  ADN
<213>  Homo sapiens


<220>
<221>  Región V
<222>  (1)..(324)
<223>  secuencia de cadena ligera (Vkappa) kappa de variable NI-101.12F6A

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(324)

<400>  40
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
```

```
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat        96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

tta aat tgg tat caa cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc       144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc       192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct       240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cag cag agt tac agt acc cct ctc       288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
                85                  90                  95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt                       324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 42
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(121)
<223> secuencia de cadena (Vh) pesada de varibale NI-101.13A

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(121)
<223> secuencia de cadena (Vh) pesada de variable NI-101.13B

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ser Gly Ser Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

461

Cys Ala Arg Ser Arg Trp Gly Ser Ser Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(107)
<223> secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13A

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(108)
<223> secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13B

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

462

20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg
85 90 95

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

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13A, CDR1

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13A, CDR2
<400> 47

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(8)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13A, CDR3

<400> 48

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(11)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13B, CDR1

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(7)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de Secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13B, CDR2

<400> 50

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

404

<223> región que determina la complementariedad (CDR)

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS DIVERSAS
<222> (1)..(9)
<223> Denominación de secuencias de proteína CDR en Nomenclatura Kabat de secuencia de cadena (Vl) ligera de varibale NI-101.13B, CDR3

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 52
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(363)
<223> secuencia de cadena (Vh) pesada de varibale NI-101.13A

<400> 52
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca 300

cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

<210> 53
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(363)
<223> secuencia de cadena (Vh) pesada de variable NI-101.13B

<400> 53
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agaagaagtt actactgggg ctggatccgc 120

cagtccccag ggaaggggct ggagtggagt ggaagtatcc attatagcgg gagcacctac 180

tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatctgtag acacgtccaa gaaccagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt taccgccgca gacacggctg tctattactg tgcgagatca 300

cgttggggca gcagctgggt atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

405

<210> 54
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(324)
<223> secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13A

<400> 54
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccagaacgtt cggccaaggg 300

accaaggtgg agatcaaacg tacg 324

<210> 55
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(327)
<223> secuencia de cadena (Vl) ligera de variable NI-101.13B

<400> 55
gacatccagt tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagattcca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctcgaac gttcggccaa 300

gggaccaagc tggagatcaa acgtacg 327

<210> 56
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Región V
<222> (1)..(372)
<223> Secuencia de cadena (Vh) pesada de variable NI-101.11

<400> 56
gaggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cgccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggaactaa aaaatactat 180

acagactccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240

466.

ctgcaaatga acaccctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatagg 300

ggtataggag ctcggcgggg gccgtactac atggacgtct ggggcaaagg gaccacggtc 360

accgtctcct ca 372

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/000053

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIMPSON J ET AL: "Autoantibodies to Alzheimer and normal brain structures from virus-transformed lymphocytes." JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY NOV 1986, vol. 13, no. 1, November 1986 (1986-11), pages 1-8, XP002430383 ISSN: 0165-5728 the whole document	1-6,9, 10, 14-19,21
Y		7,8, 11-13, 20,22-51
Y	WO 2006/103116 A (BIOTHERAPIX MOLECULAR MEDICINE [ES]; TORAN GARCIA JOSE LUIS [ES]; LAIN) 5 October 2006 (2006-10-05) cited in the application the whole document	7,8, 11-13, 20,22-51

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 March 2008	09/04/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/000053

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GEYLIS ET AL: "Immunotherapy of Alzheimer's disease (AD): From murine models to anti-amyloid beta (Abeta) human monoclonal antibodies" AUTOIMMUNITY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 33-39, XP005203566 ISSN: 1568-9972 page 34, column 2, line 11 - page 35, column 2, line 12	24,25
Y	EP 1 172 378 A (DODEL RICHARD DR [DE]; YANSHENG DR DU [US]) 16 January 2002 (2002-01-16) page 2, paragraph 13 - page 3, paragraph 26	24-51
Y	WEKSLER M E ET AL: "Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals" EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 37, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 943-948, XP002903206 ISSN: 0531-5565 page 947, column 1, line 20 - column 2, line 31	24-51
Y	DU Y ET AL: "Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity" BRAIN, OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD, GB, vol. 126, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 1935-1939, XP002360367 ISSN: 0006-8950 the whole document	24-51
Y	GEYLIS V ET AL: "Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 26, no. 5, May 2005 (2005-05), pages 597-606, XP004748495 ISSN: 0197-4580 page 598, column 1, line 30 - page 604, column 1; line 10	24-51

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/000053

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HYMAN B T ET AL: "Autoantibodies to Amyloid-beta and Alzheimer's Disease" ANNALS OF NEUROLOGY, BOSTON, US, vol. 49, no. 6, 2001, pages 808-810, XP001030614 ISSN: 0364-5134 the whole document	24-51
A	US 2006/235207 A1 (TSUCHIYA MASAYUKI [JP] ET AL) 19 October 2006 (2006-10-19) page 1, paragraph 4 - page 4, paragraph 66	
A	WO 2005/018424 A (RES FOUND MENTAL HYGIENE [US]; MILLER DAVID L [US]; MEHTA PANKAJ [US];) 3 March 2005 (2005-03-03) page 1, paragraph 2 - page 9, paragraph 29	
A	SIMPSON J ET AL: "Antibodies to normal and Alzheimer human brain structures from non-immunised mice of various ages." FEBS LETTERS 8 JUN 1987, vol. 217, no. 1, 8 June 1987 (1987-06-08), pages 62-64, XP002430384 ISSN: 0014-5793 the whole document	

410

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/000053

Box No. 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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 43-46 are directed to a method of treatment and a diagnostic method 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 No. 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 allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/000053

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006103116 A	05-10-2006	EP 1868643 A1	26-12-2007
EP 1172378 A	16-01-2002	NONE	
US 2006235207 A1	19-10-2006	AU 2003284427 A1	18-06-2004
		EP 1571211 A1	07-09-2005
		WO 2004048571 A1	10-06-2004
WO 2005018424 A	03-03-2005	NONE	

413

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 8001[illegible]

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 51,293
FECHA : JULIO 14 DE 2009

No. 09-081882- -00000-0000

Fecha: 2009-08-05 17:16:01 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 415

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	106430892	13/07/2009	$5,679,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES		111,000.00
		TOTAL :	$	111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 17119-891001-0

414

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-081882- -00000-0000
Fecha: 2009-08-05 17:16:01 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 415

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176[illegible]

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 53,100
FECHA : JULIO 21 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19805542	21/07/2009	22,635,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02 PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	643,000.00
		TOTAL : $	643,000.00

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Cdo 17119-841-001-0

4 LS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 53,115
FECHA : JULIO 21 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19805542	21/07/2009	22,635,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	688,000.00
		TOTAL : $	688,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cda 17119-841-001-0

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [ ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

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

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

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

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-081882- -00000-0000
Fecha: 2009-08-05 17:16:01 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 415

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
UNIVERSITY OF ZURICH

REFERENCIA	Radicación No.	9 81882
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/000053
	Fecha inicio fase nacional	05/08/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	9288

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.:9 81882

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha_____.
adpa11 14 AGO. 2009