Industria y Co
SUPERINTENC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 14-105077- -00000-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-291212- -00005-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

SOLICITU

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/18**

71. SOLICITANTE **AC IMMUNE S.A. y GENENTECH, INC.**

DOMICILIO LAUSANNE, SUIZA y ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

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

22. BOGOTÁ, D.C. 15 MAY 2014

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-105077- -00000-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

DIRECCIÓN DE NUEVA
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FU

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-291212- -00005-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

1. Identificación del Trámite

☐ **Conversión** ☒ **División** ☐ **Fusión**

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del Solicitante:

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

AC IMMUNE S.A. y GENENTECH, INC.
Nombre o Denominación / Nombre o Razón Social Completa

ALICIA LLOREDA RICAURTE
Nombre Representante Legal

Tipo de Empresa: Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☒

Documento de Identificación: ☒ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número **39.690.713**

Nacionalidad / País de Constitución	Dirección y Domicilio del Titular	Ciudad
Suiza y Estados Unidos de América	EPFL-PSE Building B, CH-1015, Lausanne, Suiza y 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América	Lausanne y South San Francisco

Dirección Electrónica	Fax	Número Telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

☒ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del Apoderado:

LLOREDA RICAURTE ALICIA	C.C. 39.690.713	53.215
Apellidos y Nombre	Documento de Identificación	Tarjeta Profesional

Dirección y Domicilio		Ciudad
Calle 72 No. 5-83 Piso 5º		Bogotá D.C.
Dirección Electrónica	**No. Fax**	**Número Telefónico**
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del Trámite

CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente No. _____ De: _____ A: _____	**Expediente No.** 13-291.212 **No. Divisionales** 1	**Expediente No.** _____ **Expediente No.** _____

5. Comprobante de Pago No. 14-0012352 **Fecha:** Febrero 3, 2014

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
- ☐ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

ALICIA LLOREDA RICAURTE		
Nombre y apellidos	Representante Apoderado	**Firma**
C.C. 39.690.713 de Usaquén		**53.215**
Identificación		Tarjeta Profesional

2

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: AAAA / MM / DD	Recorrido:
2020	14 / 5 / 15	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: □ Traslado: □ Convenio: □

Radicador: Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-105077	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 9 ARCHIVOS:
9 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.
EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO (2)
JM

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012352

Bogotá D.C., Febrero 03 de 2014 - 16:36:23

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	12339	03/02/2014		55.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133669	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133670	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133671	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133672	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133673	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133674	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133675	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133676	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133677	24/12/2013		505.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MII

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-291212- -00005-0000

Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

No. 14-105077- -00000-0000

Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0050866

Bogotá D.C., Mayo 14 de 2014 - 11:05:17

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	12003	03/02/2014		494.000.00
RECIBO DE CA	999999999	12037	03/02/2014		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	12038	03/02/2014		1.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
16	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	496.000.00
				$496.000.00

==========

SON: **CUATROCIENTOS NOVENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
*****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5
No. 14-105077- -00000-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-291212- -00005-0000
Fecha: 2014-05-15 16:22:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que se une específicamente a al menos un epítope en la proteína amiloide-β en donde el epítope comprende al menos dos residuos de aminoácido consecutivos – Lys – Leu – predominantemente involucrados en la unión al anticuerpo dentro de la siguiente secuencia nuclear Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3 (SEC ID No.: 10)
en donde

Xaa_1 es His, Asn, Gln Lys o Arg;

Xaa_2 es Asn o Gln; y

Xaa_3 es Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile.

2. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que se une específicamente a al menos un epitope en la proteína amiloide-β en donde dicho epítope comprende al menos dos residuos de aminoácido consecutivos – Phe – Phe – predominantemente involucrados en la unión al anticuerpo dentro de la siguiente secuencia nuclear (SEC ID No.: 9):
Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – Xaa_6, en donde

Xaa_3 es Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile;

Xaa_4 es Ala, Val, Leu, Ser o Ile;

Xaa_5 es Glu o Asp, y

Xaa_6 es Glu o Asp.

3. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que se une específicamente a al menos un primer y un segundo epítope en la proteína amiloide-β en donde dichos primero y segundo epítope comprenden
(i) al menos dos residuos de aminoácido consecutivos Phe – Phe, y

(ii) al menos dos residuos de aminoácido consecutivos Lys – Leu,

predominantemente involucrados en la unión al anticuerpo, en donde los dos aminoácidos consecutivos Phe – Phe del primer epítope y los dos aminoácidos consecutivos Lys – Leu del segundo epítope están separados por al menos un residuo de aminoácido que une el anticuerpo o un fragmento del mismo menos bien que los dos residuos de aminoácido consecutivos Phe–Phe del primer epítope o los dos residuos de aminoácido consecutivos Lys–Leu del segundo epítope, y están dentro de la siguiente secuencia nuclear:

– Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – $Xaa_{6,}$ en donde

Xaa_1 es His, Asn, Gln Lys o Arg;

Xaa_2 es Asn o Gln;

Xaa_3 es Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile;

Xaa_4 es Ala, Val, Leu, Ser o Ile;

Xaa_5 es Glu o Asp; y

Xaa_6 es Glu o Asp.

4. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, que se une específicamente a al menos un primer y un segundo epítope en la poteína amiloide-β que comprende al menos los dos residuos de aminoácido consecutivos Phe – Phe y Lys – Leu predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde dicho primer epítope comprende la secuencia de aminoácido Val – Phe – Phe – Ala – Glu – Asp (SEC ID No.: 7) y dicho segundo epítope comprende la secuencia de aminoácido His – Gln – Lys – Leu – Val (SEC ID No.: 8).

5. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une predominantemente a los residuos de aminoácido consecutivos –Lys-Leu- del primer epítope y/o los residuos de aminoácido consecutivos –Phe-Phe- del segundo epítope.

6. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende al menos una Región Complementaria Determinante (CDR) de origen no humano y al menos una región marco y, opcionalmente, una región constante, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de unirse específicamente a la proteína amiloide-β, péptido amiloide-β monomérico, péptidos amiloides poliméricos solubles que comprenden una pluralidad de unidades monoméricas de amiloide-β, fibras, fibrillas o filamentos de amiloide-β y/o un péptido polimérico de amiloide-β aislado o como parte de una placa de amiloide-β, en un epítope que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: – Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – $Xaa_{6,}$ (SEC ID No.: 11), en donde:

Xaa_1 es His, Asn o Gln;

Xaa_2 es Asn o Gln;

Xaa_3 es Val, Leu o Ile;

Xaa_4 es Ala o Val;

Xaa_5 es Glu o Asp; y

Xaa_6 es Glu o Asp.

7. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende al menos una Región Complementaria Determinante (CDR) seleccionada del grupo de secuencias que consiste de: una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2; una HCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; y una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4, en donde el anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se une a β-amiloide.

8. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende regiones variables con al menos dos CDRs seleccionadas del grupo de secuencias que consiste de: una HCVR CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1; una HCVR CDR2 teniendo una secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2; una HCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; una LCVR CDR1, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No. 4; una LCVR CDR2, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No. 5; y LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 6.

9. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende

(i) regiones variables de cadena pesada HCVR CDR1, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1, HCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2; y HCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; y/o

(ii) regiones variables de cadena liviana que comprenden LCVR CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4; LCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 5; y LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 6.

10. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende regiones variables con al menos tres CDRs seleccionadas del grupo de secuencias que consiste de: una HCVR CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1, una HCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2, una HCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; una LCVR

CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4; una LCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 5; y una LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.:6, en donde cada CDR está presente una sola vez en el anticuerpo.

11. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende regiones variables con al menos cuatro CDRs seleccionadas del grupo que consiste de: una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) CDR1, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1; una HCVR CDR2, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2; una HCVR CDR3, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4; una LCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 5; y una LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.:6, en donde cada CDR está presente una sola vez en el anticuerpo.

12. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende regiones variables con al menos cinco CDRs seleccionadas del grupo que consiste de: una CDR1 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1; una HCVR CDR2, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2; una HCVR CDR3, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; una CDR1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4; una LCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 5; y una LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.:6, en donde cada CDR está presente una sola vez en el anticuerpo.

13. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende regiones variables con una HCVR CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 1, una HCVR CDR2, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 2, y una HCVR CDR3, teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 3; o una LCVR CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 4, una LCVR CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.: 5, y una LCVR CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido de la SEC ID No.:6.

14. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende una región CDR de cadena liviana y de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácido de la SEC ID No. 1 – 6, en donde se cambia al menos uno de los aminoácidos a través de una sustitución conservativa de tal manera que el anticuerpo o el fragmento del mismo mantiene su funcionalidad completa.

15. Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la reivindicación 14, en donde en la secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena liviana (LCVR) de la SEC ID No.; 5, se reemplaza la Lys en la posición Kabat 50 con Arg, Gln o Glu, y / o se reemplaza la Asn en la posición Kabat 53 con Ala, Val, Leu, Ser e Ile.

16. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, que comprende regiones marco, en donde las secuencias de dichas regiones marco son

(i) secuencias germinales humanas V_K del subgrupo KABAT V_KII; o

(ii) secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII.

17. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 16, en donde al menos uno de los aminoácidos de las regiones marco se cambia mediante una sustitución a un aminoácido de la región correspondiente del anticuerpo murino humanizado ACI-01-Ab7C2 o un aminoácido conservativo a éste.

18. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 17, en donde (a) el aminoácido en la posición Kabat 47 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Pesada es Leu; y/o (b) el aminoácido en la posición Kabat 94 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Pesada es Ser; y/o (c) el aminoácido en la posición Kabat 87 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Liviana es Tyr o Phe.

19. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el aminoácido en la posición Kabat 47 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Pesada es Leu, y el aminoácido en la posición Kabat 94 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Pesada es Ser y el aminoácido en la posición Kabat 87 en las regiones marco de la Región Variable de Cadena Liviana es Tyr o Phe.

20. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 12 y/o la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 13.

21. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende:
(i) una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 12 y una región constante de cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 14 o

(ii) una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) completa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 13 y una región constante de cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 14.

22. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) completa que incluye las secuencias señal que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 16.

23. Un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende
(i) una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 15 y una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 17 o

(ii) una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 16 y una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 17.

24. Un anticuerpo que comprende una región variable de la SEC ID No.: 27, o una variante de la misma.

25. Una línea celular que expresa el anticuerpo de la reivindicación 24.

26. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, que comprende el paso de cultivar la línea celular de la reivindicación 25.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: C07K 16/18
(22) Fecha de solicitud: 27-01-09	(71) Solicitante(s): **AC IMMUNE S.A. Y GENENTECH, INC.**
(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País*** 06014730.3 14-07-06 EP 06020765.1 02-10-06 EP 60/943,289 11-06-07 US 60/943,499 12-06-07 US	(72) Inventor(es): PFEIFER, Andrea; PIHLGREN, Maria; MUHS, Andreas y WATTS, Ryan.
	(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-02-09 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 13-07-07 No. de solicitud: ***PCT/US2007/073504***	(87) Publicación internacional Fecha: ***24-01-08*** N° publicación: ***WO 2008/011348 A3***
(54) Titulo: **ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE**	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que se une específicamente a al menos un epítope en la proteína amiloide-β en donde el epítope comprende al menos dos residuos de aminoácido consecutivos – Lys – Leu – predominantemente involucrados en la unión al anticuerpo dentro de la siguiente secuencia nuclear Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3 (SEC ID No.: 10)
en donde
Xaa_1 es His, Asn, Gln Lys o Arg;
Xaa_2 es Asn o Gln; y
Xaa_3 es Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile.

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-08-13-587

DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS

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

Certificado Notarial, documento escrito en inglés y en español.



Atestación

Yo, el suscrito notario público de Basilea, Suiza, Dr. Ronald M. Müller, por el presente certifico que las firmas adjuntas al presente son las firmas auténticas del Profesor Andrea Pfeifer, ciudadano alemán, residente en Saint-Légier-La Chiésaz, Suiza, y del Dr. Andreas Muhs, ciudadano alemán, residente en Pully, Suiza, ambos actuando por AC Immune SA, en Ecublens/VD, Suiza, una compañía debidamente constituida y legalmente existente bajo las leyes de Suiza, con oficina registrada en Parc scientifique EPFL, PSE-B en Ecublens/VD, evidenciado por un resumen del registrador comercial, Profesor Andrea Pfiefer registrado como "directora", Dr. Andreas Muhs, registrado como "director", ambos con firma conjunta por AC Immune SA, ambos teniendo suficiente autoridad para ejecutar el poder anterior.

La autenticidad de las firmas fue establecida por medio de comparación.

Basilea, Suiza, este día 23 (veintitrés) de julio de 2008 (dos mil ocho).

Oblea notarial.

Leg. Prot. No. 907/2008

(firma: ilegible)
Dr. R. M. Müller
Notario



APOSTILLA

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

1. País: Suiza
   Este documento oficial
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como (ilegible)
4. y certificado por el sello de (ilegible)

Certificado

5. en Basilea
6. el día 23 de julio de 2008
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 6'614/11'100
9. Sello/Estampilla
   Sello de la Cancillería de Estado
10. Firma: ilegible
    Heidi Fischer

Autenticación de firma No. 092 en el Consulado de Colombia en Berna.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 13 de agosto de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
09 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Los abajo firmados,

AC Immune SA

con domicilio en

EPFL - PSE Building B,
CH - 1015 Lausanne, Switzerland

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

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

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

Dado y firmado

The undersigned,

AC Immune SA

domiciled at

EPFL - PSE Building B,
CH - 1015 Lausanne, Switzerland

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

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

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
09 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

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

Given and signed this

Andrea Pfeifer, CEO

Andreas Marks
CSO

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

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

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

State
City
On this day of , 200 , personally came , to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of , the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the State of , , domiciled at the City of , County of , State of , , legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of the State of ; that the deponent is authorized by said Company to co this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.
The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , State of , under date of , and hereby certifies that under the laws of said State the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
09 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Colombia · Suiza
1908 · 2008

Libertad y Orden

Consulado de Colombia
Berna

AUTENTICACION DE FIRMA No. 092

BERNA, 29 DE JULIO DEL 2008

El suscrito Segundo Secretario Encargado
de las Funciones Consulares de la Embajada de la República de Colombia

CERTIFICA

Que la señora ***HEIDI FISCHER***, que autoriza el presente documento, ejercía legalmente en la fecha expresada, las funciones de Oficial de la Cancillería de Estado del Cantón de Basilea y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales, de acuerdo con el registro que se lleva en este Consulado.

El suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares de la Embajada, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento autenticado.

CESAR H. ESTRADA MOLINA

CONSULADO DE COLOMBIA

- Pagado Impuesto de Timbre $ 16.00
- Pagado Derechos Consulares $ 15.00

NOTARIA SESENTA 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
09 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Attestation

I, the undersigned notary public of Basel, Switzerland, Dr. Roland M. Müller, certify herewith that the signatures attached heretofore are the genuine signatures of **Prof. Andrea Pfeifer**, German citizen, residing in Saint-Légier-La Chiésaz, Switzerland, and **Dr. Andreas Muhs**, German citizen, residing in Pully, Switzerland, both acting for **AC Immune SA**, in Écublens/VD, Switzerland, a company duly organized and legally existing under the laws of Switzerland, with registered seat at Parc scientifique EPFL, PSE-B in Écublens/VD, evidenced by an extract from the register of commerce, Prof. Andrea Pfeifer registered as "directrice", Dr. Andreas Muhs registered as "directeur", both with joint signature for AC Immune SA, both having sufficient authority to execute the above power of attorney.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

BASEL, Switzerland, this 23rd (twenty-third) day of July 2008 (twothousandandeight).

Dr. R.M. Müller
Notar

Leg.Prot.Nr. 907 /2008

APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)
This official document
2. is signed by .....
.....
3. in his/her function as .....
4. and certified by the seal of the .....
.....

Certified 23. Juli 2008

5. in Basel (Bâle)
6. on .....
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt .....
8. No. 66741700

STATE CHANCERY * BASEL-STADT *

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. TRASO CONSTAR: QUE LA FOTOCOPIA QUE ANTECEDE COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. - REPUBLICA DE COLOMBIA
09 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Heidi Fischer

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-03-31-206

DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por T. Lawrence
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas

Certificado

5. en Washington, D.C. 6. el día 5 de febrero de 2009
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos
8. No. 09012904-1
9. Sello/Estampilla
   Sello del Departamento de Estado
   Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
    Sonya N. Johnson

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 ABR -3 P 7:39

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

984559

DITA ESCOBAR
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

02 de febrero de 2009

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ANEXA AL PRESENTE SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 10 de diciembre de 2007.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

(firma: ilegible)
T. LAWRENCE
Funcionario que Certifica

Formato PTO-1595 (modificado) (Rev 6-93)	Exp. No. 089667-0103 Departamento de Comercio de los EU Oficina de Patentes y Marcas
CARATULA DE REGISTRO **PATENTES UNICAMENTE**	
Para el Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos: Por favor registre los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.	
1. Nombre de la parte(s) que transfiere: Ryan WATTS ¿Se adjunta nombre(s) adicional de la parte que cede? NO	2. Nombre y dirección de la parte(s) que recibe: GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 ¿Se adjuntan nombre(s) & dirección adicionales: No
3. Naturaleza del traspaso: **Corrección al Traspaso Previamente Registrado en Reel 020115, Frame 0504 el 14 de noviembre de 2007** Fecha de Ejecución: 21 de agosto de 2007	Nombre(s) & dirección adicionales: ☐ Sí ☒ No
4. Número(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Número(s) de Solicitud de Patente: 60/943.289 B. Número(s) de Patente: ¿Se adjuntan números adicionales? NO	
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar correspondencia relacionada con este documento: (Fax 202 672 5389)	6. Número total de solicitudes/patentes comprendidas: 1 7. Total derechos (37 CFR 3.41): $40.00 Cheque Adjunto

Richard C. Peet FOLEY & LARDNER LLP Washington Harbour 3000 K Street NW, Suite 500 Washington, D.C. 20007-5143	X Autorizado para ser cargado a la cuenta de Crédito Autorizado para ser cargado a la cuenta de depósito 8. Información de Pago a. Tarjeta de Crédito Ultimos 4 Números 5962 Fecha Expiración 11/30/2008 b. Número de la cuenta de depósito 19-0741 Nombre del Usuario Autorizado
NO UTILICE ESTE ESPACIO	

9. Declaración y firma.

Según mi mejor saber y entender, la información anterior es fiel y correcta y cualquier copia adjunta es una copia fiel verdadera del documento original. El Comisionado por el presente está autorizado para cargar cualquier derecho de registro adicional que se requiera en este asunto a la cuenta de depósito anteriormente identificada.

Richard C. Peet	(firma: ilegible)	11/10/07
Nombre de la persona que firma	Firma	Fecha

Número total de páginas incluyendo carátula, anexos y documento: 9

700352940

11/14/2007
700350304

Formato PTO-1595 (modificado) (Rev 6-93)	Exp. No. 069667-0103 Departamento de Comercio de los EU Oficina de Patentes y Marcas
CARATULA DE REGISTRO **PATENTES UNICAMENTE**	
Para el Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos: Por favor registre los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.	
1. Nombre de la parte(s) que transfiere: Ryan J. WATTS ¿Se adjunta nombre(s) adicional de la parte que cede? NO	2. Nombre y dirección de la parte(s) que recibe: GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 ¿Se adjuntan nombre(s) & dirección adicionales: No
3. Naturaleza del traspaso: **TRASPASO** Fecha de Ejecución: 21 de agosto de 2007	Nombre(s) & dirección adicionales: ☐ Sí ☒ No
4. Número(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Número(s) de Solicitud de Patente: 60/943.289 B. Número(s) de Patente: ¿Se adjuntan números adicionales? NO	
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar correspondencia	6. Número total de solicitudes/patentes comprendidas: 1

relacionada con este documento: (Fax 202 672 5389) Richard C. Peet FOLEY & LARDNER LLP Washington Harbour 3000 K Street NW, Suite 500 Washington, D.C. 20007-5143	7. Total derechos (37 CFR 3.41): $40.00 Cheque Adjunto X Autorizado para ser cargado a la cuenta de Crédito Autorizado para ser cargado a la cuenta de depósito 8. Información de Pago a. Tarjeta de Crédito Ultimos 4 Números 3566 Fecha Expiración 12/31/2009 b. Número de la cuenta de depósito 19-0741 Nombre del Usuario Autorizado

NO UTILICE ESTE ESPACIO

9. Declaración y firma.

Según mi mejor saber y entender, la información anterior es fiel y correcta y cualquier copia adjunta es una copia fiel verdadera del documento original. El Comisionado por el presente está autorizado para cargar cualquier derecho de registro adicional que se requiera en este asunto a la cuenta de depósito anteriormente identificada.

Benjamín A. Berkowitz	(firma: ilegible)	11/13/07
Reg. No. 59.349		
Nombre de la persona que firma	Firma	Fecha

Número total de páginas incluyendo carátula, anexos y documento: 2

Expediente No. PR2470-2

T R A S P A S O

POR CUANTO, Ryan J. Watts, un ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402 (en adelante "CEDENTE"), ha inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

para la cual ha presentado una solicitud No. Serial 60/943.289 (Expediente No. PR2470-2) para Patente de Invención el 11 de junio de 2007; y

POR CUANTO, GENENTECH, INC., una sociedad organizada y existente bajo y en virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene un lugar de negocios en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, desea adquirir un interés en y de dicha invención, y en y de las Patentes de Invención para ser obtenido por lo tanto;

AHORA, POR LO TANTO, sépase por todos a quienes concierna;

Que por una contraprestación buena y valiosa el recibo de lo cual se reconoce por el presente, dicho CEDENTE ha y por el presente vende, cede, transfiere y traspasa a GENENTECH, INC., sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de Propiedad Industrial, en y de dicha invención, y en y de cualquiera y toda Patente de Invención para ser otorgada y expedida por lo tanto y cualquier continuación, división, renovación, o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención cualquier reexpedición o reexamen

de la misma, no únicamente para, y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, pero para, y en todos los otros países; y ha sido y por el presente está autorizado y solicita que las agencias gubernamentales apropiadas expidan dichas Patentes de Invención a GENENTECH, INC., de conformidad con este Traspaso.

Dicho CEDENTE conviene y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para permitir que GENENTECH, INC. disfrute hasta el límite completo el derecho, título e interés por el presente traspasado en los Estados Unidos y países extranjeros. Dicha cooperación por dicho CEDENTE incluye la producción oportuna de los datos y documentos pertinentes, dar testimonio, ejecución de recursos, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra asistencia todo hasta donde se considere necesario o deseable por parte de GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés por el presente traspasado; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes para reexpedición de cualquiera de dichas patentes; (d) para interferencia u otro procedimiento de prioridad que comprenda a dicha invención; y (e) para procesos jurídicos que comprendan a dicha invención y cualquier solicitud por lo tanto y cualquier patente otorgada sobre ella, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, concursos de prioridad, procedimientos de uso público, acciones de infracción y acciones de tribunales; siempre y cuando, sin embargo, que el gasto incurrido por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación sea pagado por GENENTECH, INC.

Los términos y acuerdos de este traspaso entrarán en vigencia para el beneficio de GENENTECH, INC., sus sucesores, cesionarios y otros

representantes legales, y será obligatorio para dicho CEDENTE, sus herederos, representantes legales, y cesionarios respectivos.

Dicho CEDENTE por el presente garantiza y afirma que él no ha celebrado y no celebrará ningún traspaso, contrato, o entendimiento que entre en conflicto con ello.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, firmo como sigue.

South San Francisco
Fechado: 8/21/07

(firma: ilegible)
Ryan J. Watts

REGISTRADO: 12/10/2007

PATENTE
REEL: 020229 FRAME: 0873

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 31 de marzo de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the fifth of February, 2009

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 09012904-1

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

A 1739296

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 02, 2009

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON DECEMBER 10, 2007.

By Authority of the

Under Secretary of Commerce for Intellectual Property

and Director of the United States Patent and Trademark Office

T. LAWRENCE

Certifying Officer

Atty. Dkt. No. 089667-0103

D-1595 (modified) U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

The Director of the United States Patent and Trademark Office: Please record the attached original documents or copies thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Ryan WATTS

Additional conveying party(ies) **NO**

Nature of conveyance:
Correction to Assignment Previously Recorded on Reel 020115, Frame 0504 on November 14, 2007
Execution Date:
August 21, 2007

2. Name and address of receiving party(ies):

GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? **NO**

3. Application number(s) or patent number(s):

If this is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application Number(s):	B. Patent Number(s):
60/943,289	

Additional numbers attached? **NO**

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be Faxed: (202 672 5399)

Richard C. Peet
FOLEY & LARDNER LLP
Washington Harbour
3000 K Street NW, Suite 500
Washington, D.C. 20007-5143

6. Total number of applications/patents involved: **1**

7. Total fee (37 C.F.R. § 3.41): **$40.00**

Check Enclosed
X Authorized to be charged to credit card
Authorized to be charged to deposit account

8. Payment Information

a. Credit Card Last 4 Numbers **5962**
Expiration Date **11/30/2008**
b. Deposit account number **19-0741**
Authorized User Name

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature:

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. The Commissioner is hereby authorized to charge any additional recordation fees which may be required in this matter to the above-identified deposit account.

Richard C. Peet		11/20/07
Name of person signing	Signature	Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 9

OP $40.00 60943289

11/14/2007
700350203

Atty. Dkt. No. 069667-0103

PTO-1595 (modified)
(8),

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

To the Director of the United States Patent and Trademark Office: Please record the attached original documents or copies thereof.

1. Name of conveying party(ies):

Ryan J. WATTS

Additional conveying party(ies) NO

2. Name and address of receiving party(ies):

GENETECH, INC.
1 DNA Way, South San Francisco
California 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? NO

3. Nature of conveyance:

ASSIGNMENT

Execution Date:

August 21, 2007

4. Application number(s) or patent number(s):

If this is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application Number(s):	B. Patent Number(s):
60/943,289	

Additional numbers attached? NO

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Richard C. Peet
FOLEY & LARDNER LLP
Washington Harbour
3000 K Street NW, Suite 500
Washington, D.C. 20007-5143

6. Total number of applications/patents involved: 1

7. Total fee (37 C.F.R. § 3.41): $40.00

Check Enclosed
X Authorized to be charged to credit card
Authorized to be charged to deposit account

8. Payment Information

a. Credit Card Last 4 Numbers 3566
Expiration Date 12/31/2009

b. Deposit account number 19-0741
Authorized User Name

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature:

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. The Commissioner is hereby authorized to charge any additional recordation fees which may be required in this matter to the above-identified deposit account.

Benjamin A. Berkowitz		11/13/07
Reg. No. 59,349 Name of person signing	Signature	Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 2

H_2116380.1

Docket No. PR2470-2

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ryan J. Watts, a citizen of United States of America, residing at 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

HUMANIZED ANTIBODY

for which an application Serial No. 60/943,289 (Docket No. PR2470-2) has been filed by him for Letters Patent on June 11, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows:

South San Francisco

Dated: 5/21/07

Ryan J. Watts

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-03-31-207

DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por M. K. Carter
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas

Certificado

5. en Washington, D.C. 6. el día 16 de marzo de 2009
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos
8. No. 09017120-3
9. Sello/Estampilla
   Sello del Departamento de Estado
   Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
    Fernesia T. Crawford

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 ABR -1 P 10:15

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

984043

CUYA FIRMA AUTÓGRAFA DE ESTE
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

10 de marzo de 2009

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ANEXA AL PRESENTE SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 13 de diciembre de 2007.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

(firma: ilegible)
M. K. CARTER
Funcionario que Certifica

Formato PTO-1595 (modificado) (Rev 6-93)	Exp. No. 089667-0109 Departamento de Comercio de los EU Oficina de Patentes y Marcas
CARATULA DE REGISTRO **PATENTES UNICAMENTE**	
Para el Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos: Por favor registre los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.	
1. Nombre de la parte(s) que transfiere: Ryan WATTS ¿Se adjunta nombre(s) adicional de la parte que cede? NO	2. Nombre y dirección de la parte(s) que recibe: GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 ¿Se adjuntan nombre(s) & dirección adicionales: No
3. Naturaleza del traspaso: **Corrección al Traspaso Previamente Registrado en Reel 020115, Frame 0516 el 14 de noviembre de 2007** Fecha de Ejecución: 21 de agosto de 2007	Nombre(s) & dirección adicionales: ☐ Sí ☒ No
4. Número(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Número(s) de Solicitud de Patente: 60/943.499 B. Número(s) de Patente: ¿Se adjuntan números adicionales? NO	
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar correspondencia relacionada con este documento: (Fax 202 672 5389)	6. Número total de solicitudes/patentes comprendidas: 1 7. Total derechos (37 C.F.R. § 3.41): $40.00

J

Richard C. Peet FOLEY & LARDNER LLP Washington Harbour 3000 K Street NW, Suite 500 Washington, D.C. 20007-5143	Cheque Adjunto X Autorizado para ser cargado a la cuenta de crédito Autorizado para ser cargado a la cuenta de depósito 8. Información de Pago a. Tarjeta de Crédito Ultimos 4 Números 5962 Fecha Expiración 11/30/2008 b. Número de la cuenta de depósito 19-0741 Nombre del Usuario Autorizado
NO UTILICE ESTE ESPACIO	

9. Declaración y firma.

Según mi mejor saber y entender, la información anterior es fiel y correcta y cualquier copia adjunta es una copia fiel verdadera del documento original. El Comisionado por el presente está autorizado para cargar cualquier derecho de registro adicional que se requiera en este asunto a la cuenta de depósito anteriormente identificada.

Richard C. Peet	(firma: ilegible)	12/13/07
Nombre de la persona que firma	Firma	Fecha

Número total de páginas incluyendo carátula, anexos y documento: 9

700353519

11/14/2007

700350205

Formato PTO-1595 (modificado) (Rev 6-93)	Exp. No. 069667-0109 Departamento de Comercio de los EU Oficina de Patentes y Marcas
CARATULA DE REGISTRO **PATENTES UNICAMENTE**	
Para el Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos: Por favor registre los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.	
1. Nombre de la parte(s) que transfiere: Ryan J. WATTS ¿Se adjunta nombre(s) adicional de la parte que cede? NO	2. Nombre y dirección de la parte(s) que recibe: GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990 ¿Se adjuntan nombre(s) & dirección adicionales: No
3. Naturaleza del traspaso: **TRASPASO** Fecha de Ejecución: 21 de agosto de 2007	Nombre(s) & dirección adicionales: ☐ Sí ☒ No
4. Número(s) de solicitud o número(s) de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: A. Número(s) de Solicitud de Patente: 60/943.499 B. Número(s) de Patente: ¿Se adjuntan números adicionales? NO	
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar correspondencia relacionada con este documento:	6. Número total de solicitudes/patentes comprendidas: 1 7. Total derechos (37 CFR § 3.41): $40.00 Cheque Adjunto

Richard C. Peet FOLEY & LARDNER LLP Washington Harbour 3000 K Street NW, Suite 500 Washington, D.C. 20007-5143	X Autorizado para ser cargado a la cuenta de Crédito Autorizado para ser cargado a la cuenta de depósito 8. Información de Pago a. Tarjeta de Crédito Ultimos 4 Números 3566 Fecha Expiración 12/31/2009 b. Número de la cuenta de depósito 19-0741 Nombre del Usuario Autorizado

NO UTILICE ESTE ESPACIO

9. Declaración y firma.

Según mi mejor saber y entender, la información anterior es fiel y correcta y cualquier copia adjunta es una copia fiel verdadera del documento original. El Comisionado por el presente está autorizado para cargar cualquier derecho de registro adicional que se requiera en este asunto a la cuenta de depósito anteriormente identificada.

Benjamín A. Berkowitz	(firma: ilegible)	11/13/07
Reg. No. 59.349		
Nombre de la persona que firma	Firma	Fecha

Número total de páginas incluyendo carátula, anexos y documento: 2

Expediente No. PR2470-3

TRASPASO

POR CUANTO, Ryan J. Watts, un ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en 524 Yale Drive, San Mateo, CA 94402 (en adelante "CEDENTE"), ha inventado una invención nueva y útil en

ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

para la cual ha presentado una solicitud No. Serial 60/943.499 (Expediente No. PR2470-3) para Patente de Invención el 12 de junio de 2007; y

POR CUANTO, GENENTECH, INC., una sociedad organizada y existente bajo y en virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene un lugar de negocios en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, desea adquirir un interés en y de dicha invención, y en y de las Patentes de Invención para ser obtenido por lo tanto;

AHORA, POR LO TANTO, sépase por todos a quienes concierna;

Que por una contraprestación buena y valiosa el recibo de lo cual se reconoce por el presente, dicho CEDENTE ha y por el presente vende, cede, transfiere y traspasa a GENENTECH, INC., sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de Propiedad Industrial, en y de dicha invención, y en y de cualquiera y toda Patente de Invención para ser otorgada y expedida por lo tanto y cualquier continuación, división, renovación, o sustituto de la misma, y en cuanto a Patentes de Invención cualquier reexpedición o reexamen

de la misma, no únicamente para, y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, pero para, y en todos los otros países; y ha sido y por el presente está autorizado y solicita que las agencias gubernamentales apropiadas expidan dichas Patentes de Invención a GENENTECH, INC., de conformidad con este Traspaso.

Dicho CEDENTE conviene y acuerda cooperar con GENENTECH, INC., para permitir que GENENTECH, INC. disfrute hasta el límite completo el derecho, título e interés por el presente traspasado en los Estados Unidos y países extranjeros. Dicha cooperación por dicho CEDENTE incluye la producción oportuna de los datos y documentos pertinentes, dar testimonio, ejecución de recursos, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra asistencia todo hasta donde se considere necesario o deseable por parte de GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés por el presente traspasado; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes para reexpedición de cualquiera de dichas patentes; (d) para interferencia u otro procedimiento de prioridad que comprenda a dicha invención; y (e) para procesos jurídicos que comprendan a dicha invención y cualquier solicitud por lo tanto y cualquier patente otorgada sobre ella, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, concursos de prioridad, procedimientos de uso público, acciones de infracción y acciones de tribunales; siempre y cuando, sin embargo, que el gasto incurrido por dicho CEDENTE al proporcionar dicha cooperación sea pagado por GENENTECH, INC.

Los términos y acuerdos de este traspaso entrarán en vigencia para el beneficio de GENENTECH, INC., sus sucesores, cesionarios y otros

representantes legales, y será obligatorio para dicho CEDENTE, sus herederos, representantes legales, y cesionarios respectivos.

Dicho CEDENTE por el presente garantiza y afirma que él no ha celebrado y no celebrará ningún traspaso, contrato, o entendimiento que entre en conflicto con ello.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, firmo como sigue.

South San Francisco
Fechado: 8/21/07

(firma: ilegible)
Ryan J. Watts

REGISTRADO: 12/13/07

PATENTE
REEL: 020316 FRAME: 0028

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 31 de marzo de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. has been signed by M. K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U. S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the sixteenth of March, 2009

7. by *Assistant Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 09017120-3

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Fernesia T. Crawford

A 1744018

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

March 10, 2009

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON DECEMBER 13, 2007.

By Authority of the

Under Secretary of Commerce for Intellectual Property

and Director of the United States Patent and Trademark Office

M. K. CARTER

Certifying Officer

Atty. Dkt. No. 089667-0109

odified) U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

or of the United States Patent and Trademark Office: Please record the attached original documents or copies thereof.

onveying party(ies):	2. Name and address of receiving party(ies):
VATTS	GENENTECH, INC. 1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990
nal conveying party(ies) NO	
re of conveyance: tion to Assignment Previously Recorded on el 020115, Frame 0516 on November 14, 2007 cution Date: August 21, 2007	Additional name(s) & address(es) attached? NO

plication number(s) or patent number(s):

this is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application Number(s):	B. Patent Number(s):
60/943,499	

Additional numbers attached? NO

Name and address of party to whom correspondence concerning document should be Faxed: (202 672 5399)	6. Total number of applications/patents involved: 1
Richard C. Peet FOLEY & LARDNER LLP Washington Harbour 3000 K Street NW, Suite 500 Washington, D.C. 20007-5143	7. Total fee (37 C.F.R. § 3.41): $40.00 Check Enclosed X Authorized to be charged to credit card Authorized to be charged to deposit account
	8. Payment Information a. Credit Card Last 4 Numbers 5962 Expiration Date 11/30/2008 b. Deposit account number 19-0741 Authorized User Name

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature:

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. The Commissioner is hereby authorized to charge any additional recordation fees which may be required in this matter to the above-identified deposit account.

Richard C. Peet	Richard C. Peet	12/13/07
Name of person signing	Signature	Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 9

OP $40.00 60943499

11/14/2007
700350205

Atty. Dkt. No. 089667-0109

B (modified) U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

Director of the United States Patent and Trademark Office: Please record the attached original documents or copies thereof.

1. Name of conveying party(ies):

n J. WATTS

Additional conveying party(ies) NO

Nature of conveyance:

ASSIGNMENT

Execution Date:

August 21, 2007

2. Name and address of receiving party(ies):

GENETECH, INC.
1 DNA Way, South San Francisco
California 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? NO

Application number(s) or patent number(s):

If this is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application Number(s):

60/943,499

B. Patent Number(s):

Additional numbers attached? NO

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Richard C. Peet
FOLEY & LARDNER LLP
Washington Harbour
3000 K Street NW, Suite 500
Washington, D.C. 20007-5143

6. Total number of applications/patents involved: 1

7. Total fee (37 C.F.R. § 3.41): $40.00

Check Enclosed
X Authorized to be charged to credit card
Authorized to be charged to deposit account

8. Payment Information

a. Credit Card Last 4 Numbers 3566
Expiration Date 12/31/2009

b. Deposit account number 19-0741
Authorized User Name

DO NOT USE THIS SPACE

OP $40.00 60943499

9. Statement and signature:

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document. The Commissioner is hereby authorized to charge any additional recordation fees which may be required in this matter to the above-identified deposit account.

Benjamin A. Berkowitz		11/13/07
Reg. No. 59,349		
Name of person signing	Signature	Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and document: 2

H_2116400.1

Docket No. PR2470-3

ASSIGNMENT

WHEREAS, Ryan J. Watts, a citizen of United States of America, residing at 524 Yale Drive, Mateo, CA 94402 (hereinafter "ASSIGNOR"), has invented a new and useful invention in

HUMANIZED ANTIBODY

which an application Serial No. 60/943,499 (Docket No. PR2470-3) has been filed by him for Letters tent on June 12, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the aws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that he has not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 8/21/07

Ryan J. Watts

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-03-31-208
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Traspaso de la invención llamada ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE, documento escrito en inglés y en español.

Atestación

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea, Suiza, Dr. Matthias Staehelin, por el presente certifico que las firmas anteriores son las firmas auténticas del Prof. Andrea Pfeifer, ciudadano alemán, residente en Saint-Légier-La Chiésaz, Suiza, de la señora Maria Pihlgren Bosch, ciudadana sueca, residente en St. Sulpice, Suiza, y del doctor Andreas Muhs, ciudadano alemán, residente en Pully, Suiza.

La autenticidad de las firmas fue establecida por medio de comparación.

BASILEA, Suiza, este día cuatro (4) de febrero de 2009 (dos mil nueve).

Oblea notarial
Leg. Prot. No. 479 / 2009

(firma: ilegible)
Dr. M. Staehelin
Notario Público en Basilea

APOSTILLA

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

1. País: Suiza
   Este documento público
2. ha sido firmado por (ilegible)
3. actuando como Notario Oficial
4. lleva el sello/estampilla de (ilegible)

Certificado

5. en Basilea 6. el -5 de febrero de 2009
7. por la Cancillería de Estado del Cantón de la Ciudad de Basilea
8. No. 799 / 1460
9. Sello/Estampilla 10. Firma: (ilegible)
   Cancillería de Estado Ciudad de Basilea Hanna Lauener

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 31 de marzo de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 ABR -1 P 10:14

DIR. DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

984042
ANITA ESCOBAR
COPIA FIEL AL MEDIO EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

12593-008-026

ASSIGNMENT

The undersign,

1. Andrea Pfeifer, Maria Pihlgren and Andreas Muhs

domiciled in
1. Rte de Fenil 16A, CH-1806 St. Legier, Switzerland; Rue de Centre 42A, CH-1025 St. Sulpice, Switzerland; Av. des Cerisiers 30b, CH-1009 Pully, Switzerland

hereby state under oath to be sole and true inventor of HUMANIZED ANTIBODY AGAINST AMYLOID BETA

State, as well that assign, without reservations or limitation, in favor of **AC IMMUNE S.A.**

A corporation organized and existing under the laws of Switzerland

domiciled at EPFL-SE Building B, CH-1015 Lausanne, Switzerland

all rights inherent to said invention, and that the above mentioned corporation hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent in the Republic of Colombia.

Andrea Pfeifer

Maria Pihlgren

Andreas Muhs

TRASPASO

Los abajo firmados

1. Andrea Pfeifer, Maria Pihlgren y Andreas Muhs

Domiciliado en
1. Rte de Fenil 16A, CH-1806 St. Legier, Suiza; Rue de Centre 42A, CH-1025 St. Sulpice, Suiza; Av. des Cerisiers 30b, CH-1009 Pully, Suiza

declaramos bajo juramento ser únicos y verdaderos inventor de

ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

Declaramos así mismo que cedemos y transferimos sin reserva ni limitación, a favor de

AC IMMUNE S.A.

Una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de

Suiza
domiciliada en
EPFL-SE Building B, CH-1015 Lausanne, Suiza

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada sociedad queda facultada para solicitar en su nombre la patente correspondiente en la República de Colombia

Attestation

I, the undersigned notary public of Basel, Switzerland, Dr. Matthias Staehelin, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Prof. Andrea Pfeifer**, German citizen, residing in Saint-Légier-La Chiésaz, Switzerland, of **Ms. Maria Pihlgren Bosch**, Swedish citizen, residing in St. Sulpice, Switzerland, and of **Dr. Andreas Muhs**, German citizen, residing in Pully, Switzerland.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

BASEL, Switzerland, this 4th (fourth) day of February 2009 (two thousand and nine).

M. Staehelin, Not

Dr. M. Staehelin,
Notar in Basel

Leg.Prot.Nr. 479 /2009

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
   This official document
2. is signed by Dr. iur. M. Staehelin
3. in his/her function as Advokat, Notar
4. and certified by the seal of the Gerichtsstelle

Certified

5. in Basel (Bâle) 6. on -5. Feb. 2009
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt
8. no. 799/1460
9. Seal / stamp: STATE CHANCERY * BASLE-CITY *
10. Signature: H. Lauener
    Hanna Lauener

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AC Immune

<120> Anticuerpo humanizado

<130> M1967 EP S3

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR1)

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVU AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR2)

<400> 2

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR3)

<400> 3

Gly Asp Tyr
1

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVK 1 región variable de cadena liviana humanizada (CDR1)

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVK 1 Región variable de cadena liviana humanizada (CDR2)

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVK 1 región variable de cadena liviana humanizada (CDR3)

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Epitope Aβ, región 2

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Epitope Aβ, región 1

<400> 8

His Gln Lys Leu Val
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<220>
<221> característica_misc
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>
<221> característica_misc
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

<220>
<221> característica_misc
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

<220>
<221> característica_misc
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser Asn o Gln

<220>
<221> característica_misc
<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe o Ile

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

<223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile

<220>
<221> característica_misc
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>
<221> característica_misc
<222> (10)..(10)
<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> C2 HuVK 1 variable de cadena liviana artificial humanizada

<400> 12

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena liviana de C2 artificial humanizado

<400> 13

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región constante de cadena liviana de C2 artificial humanizada

<400> 14

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena variable pesada de C2 HuVH AF 4 artificial humanizado

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 16
<211> 439
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de C2 artificial humanizado

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
        115                 120                 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
            180                 185                 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
    210                 215                 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225                 230                 235                 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
                245                 250                 255

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
            260                 265                 270
```

```
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
        275                 280                 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
    290                 295                 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
305                 310                 315                 320

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
                325                 330                 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
            340                 345                 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
        355                 360                 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
    370                 375                 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385                 390                 395                 400

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
                405                 410                 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
            420                 425                 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
        435
```

<210> 17
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Región C de cadena IG GAMMA-4 - modificada

<400> 17

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                   10                  15
```

```
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240
```

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 18
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR2)

<400> 18
Agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c 51

<210> 19
<211> 9
<212> ADN
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVH AF 4 región variable de cadena pesada humanizada (CDR3)

<400> 19
ggtgactac

<210> 20
<211> 49
<212> ADN
<213> Mus músculo

<220>
<223> C2 HuVK 1 región variable de cadena liviana humanizada (CDR1)

<400> 20
Agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21
<211> 635
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena liviana variable de C2 Hu VK 1 artificial humanizado

<400> 21
gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcctggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 22
<211> 657
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena liviana de C2 artificial humanizado

<400> 22
gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcctggtga gcctgcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gccaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa atgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 23
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Región constante de cadena liviana de C2 artifical humanizado

<400> 23

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 24
<211> 798
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada variable de C2 HuVH AF artificial humanizado

<400> 24
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca 336

<210> 25
<211> 1317

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de C2 artificial humanizado

<400> 25
gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct 120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc 360

ttcccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc gtgtccccca 660

tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 720

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 780

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 840

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1020

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140

aacaactaca agaccacgcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<210> 26
<211> 981
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>
<223> Región constante de cadena pesada de C2 artificial humanizado

<400> 26
gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300

aaatatggtc ccccgtgtcc cccatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc 840

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960

ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus músculo

<400> 27

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

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

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus músculo

<400> 28

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
        35                  40                  45

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 29
<336> 336
<212> ADN
<213> Mus músculo

<400> 29
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa 336

<210> 30
<211> 417
<212> ADN
<213> Mus músculo

<400> 30
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta 417

<210> 31
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus músculo

<400> 31

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 32
<211> 408
<212> ADN
<213> Mus músculo

<400> 32
atgraattsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaaggtgt ccaatgtgag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca 180

gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca 240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac 360

tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc 408

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 27-01-09
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18

(71) Solicitante(s): **AC IMMUNE S.A. Y GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es): PFEIFER, Andrea; PIHLGREN, Maria; MUHS, Andreas y WATTS, Ryan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	06014730.3	14-07-06	EP
	06020765.1	02-10-06	EP
	60/943,289	11-06-07	US
	60/943,499	12-06-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-02-09
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 13-07-07
No. de solicitud: ***PCT/US2007/073504***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***24-01-08***
No. Publicación : ***WO 2008/011348 A3***

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Titulo:
ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

(57) Resumen:
Reiv. 1

Un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que se une específicamente a al menos un epítope en la proteína amiloide-β en donde el epítope comprende al menos dos residuos de aminoácido consecutivos – Lys – Leu – predominantemente involucrados en la unión al anticuerpo dentro de la siguiente secuencia nuclear Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3 (SEC ID No.: 10)

en donde

Xaa_1 es His, Asn, Gln Lys o Arg;

Xaa_2 es Asn o Gln; y

Xaa_3 es Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 27-01-09
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18

(71) Solicitante(s): **AC IMMUNE S.A. Y GENENTECH, INC.**

(72) Inventor(es): PFEIFER, Andrea; PIHLGREN, Maria; MUHS, Andreas y WATTS, Ryan.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	06014730.3	14-07-06	EP
	06020765.1	02-10-06	EP
	60/943,289	11-06-07	US
	60/943,499	12-06-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 14-02-09
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 13-07-07
No. de solicitud: ***PCT/US2007/073504***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***24-01-08***
N° publicación: ***WO 2008/011348 A3***

(54) Titulo: **ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE**

Traducción Oficial Nº 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: 258054
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

17484

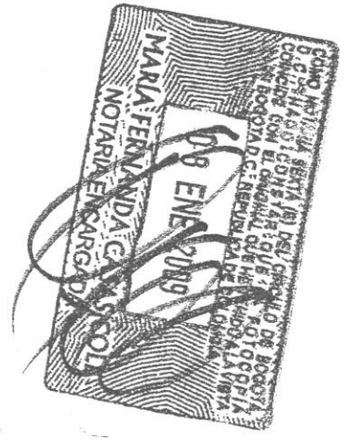
JOSE ESPINOSA

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power
Fecha: 9/13/2005
Número de páginas: 1
Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. – Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



Traducción Oficial Nº 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174485
Tba España
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

N. del T.: Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
de 1996



Traducción Oficial Nº 10-31-193

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Ministerio de Justicia No. 0920
de 1996

COMO NOTARIA SEXTA ... D.C. ... HAGO CONSTAR ... COINCIDE CON EL ORIGINAL ... BOGOTA ... VISTA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CAMACHO
NOTARIA ENCARGADA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174487

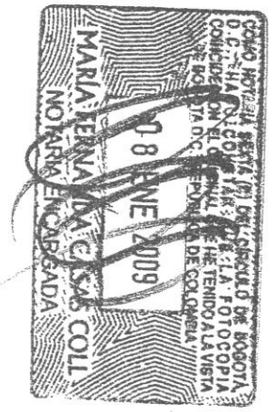
Tibar Espana

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

...DE BOGOTA
...FOTOCOPIA
...TENIDO A LA VISTA
...REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre,1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920 de 1996

NOTARIA SEXTA (6) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. - HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA - REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ARTICULO 4

SECCI0N 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria. (a) Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. SE HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOT... REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCI0N 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistente con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluído, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de tal serie)

IBARRA ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOT... REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluído, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1994

COMO NOTARIA ENCARGADA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA DE BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA ENCARGADA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

NOTARÍA (8) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA ENCARGADA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA EN BOGOTA D.C. - REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA QUINTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas*. Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones*. Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas , asociaciones y otras entidades (diferentes de la

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COPIA NOTARIA 8 DEL CIRCUITO DE BOGOTA D.C. CERTIFICO QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CAJAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCI0N 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1994

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOT COLOMBIA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum*. Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

CONFRONTO LA PRESENTE (1) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOT... REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio de Justicia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



Traducción Oficial Nº 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

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 REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174488

Libre Español

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office, Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

> "Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOT
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Traducción Oficial Nº 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
de 1996

COMO NOTARIA SESENTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

17448 A
Alber Espana
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEPTIMA 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Miniusticia No. 0920

COMO PRIMERA (1) COPIA FIEL DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA EN BOGOTA REPUBLICA DE COLOMBIA

08 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE FOTOCOPIA COINCIDE CON EL DOCUMENTO QUE SE HA TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS SOTO
NOTARIA ENCARGADA

Traducción Oficial Nº 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265286**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA ENCARGADA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA QUE ANTECEDE COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO EN ESTA NOTARIA DE BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

08 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ ... REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARÍA FERNANDA CAICEDO COLL
NOTARIA ENCARGADA

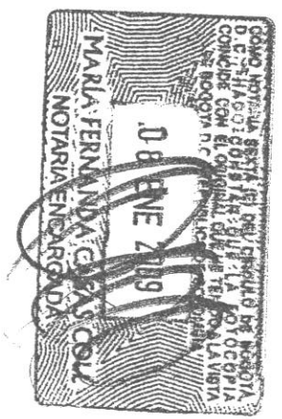
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174490
Albar Español
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

COMO NOTARIA ENCARGADA 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public,*
   State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Secretary of State

NP-24 A (REV. 4-05)

BY

OSP 05 90772

COMO NOTARIA ENCARGADA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 9/13/2005 (Date) before me, Teri Lee, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

X personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/~~they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

TERI LEE
Commission # 1514234
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Sep 18, 2008

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Power

Document Date: 9/13/2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: None

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

CONSULADO DE COLOMBIA
CONSUL NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. COLOMBIA CONSTA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS GOLL
NOTARIA ENCARGADA

Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.
Una sociedad organizada y existente
bajo las leyes del Estado de Delaware
Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Dado y firmado a los 13 dias de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under th
domiciled at laws od State of Delaware , E.U.A

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

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

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

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

Given and signed this 13 Sept 2005

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See attached.



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265282

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.



2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

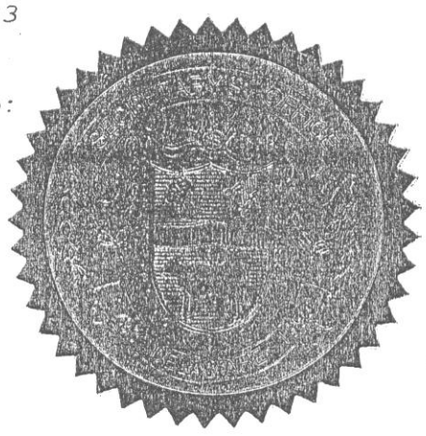
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265283

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

173

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05



AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 – 2112549



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. NACIONAL DE NOTARIADO QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA DE BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA EXCARGADA

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

COMO NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA DE BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2008
MARIA FERNANDA GALVIS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

NOTARIA SEXTA (6) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COELL
NOTARIA ENCARGADA

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COY
NOTARIA ENCARGADA

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities*. Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities*. In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

COPIA NOTARIA SESENTA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CAICEDO
NOTARIA ENCARGADA

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

COPIA NOTARIAL DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
EN BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. CERTIFICA: COMPARACION QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA DE BOGOTA - REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

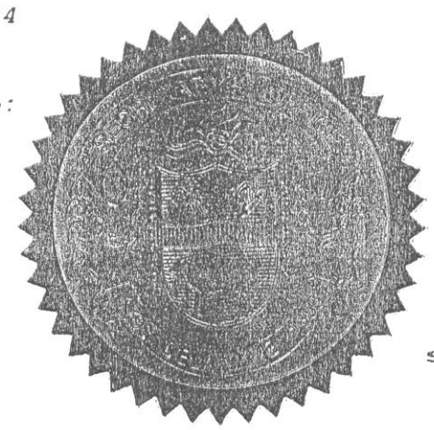
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265284

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COTEJO NOTARIAL DE COPIA (S) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. TENGO (O) A BIEN CONSTAR: QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA DE BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

08 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

194

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. AUTENTICO DOY FE QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL DOCUMENTO QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA EN BOGOTA REPUBLICA DE COLOMBIA

08 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA EN CARGADA

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

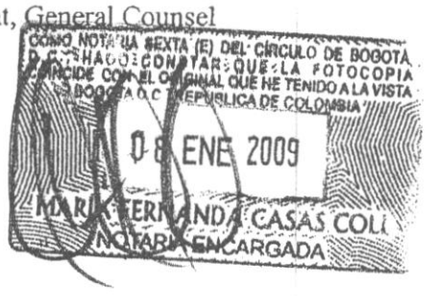
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

75841



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265285

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COMO NOTARIA SEXTA (E) DEL CÍRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA, D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 - 2112549

T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/09/00/AM/05/10/2001/ D
P ///010226224//+/2112549////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

80747

NOTARIA SEXTA (6) 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
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

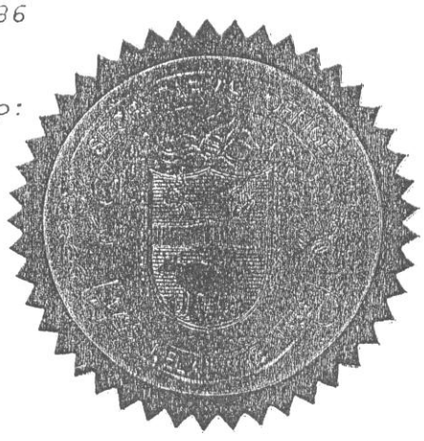
5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265286

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COMO NOTARIA SEXTA (E) 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

08 ENE 2009

MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

196

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 07:39 PM 04/16/2004
040281669 – 2112549

CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

> "Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIA (E) 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
08 ENE 2019
MARÍA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIA SESENTA (60) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. CERTIFICO QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA, D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

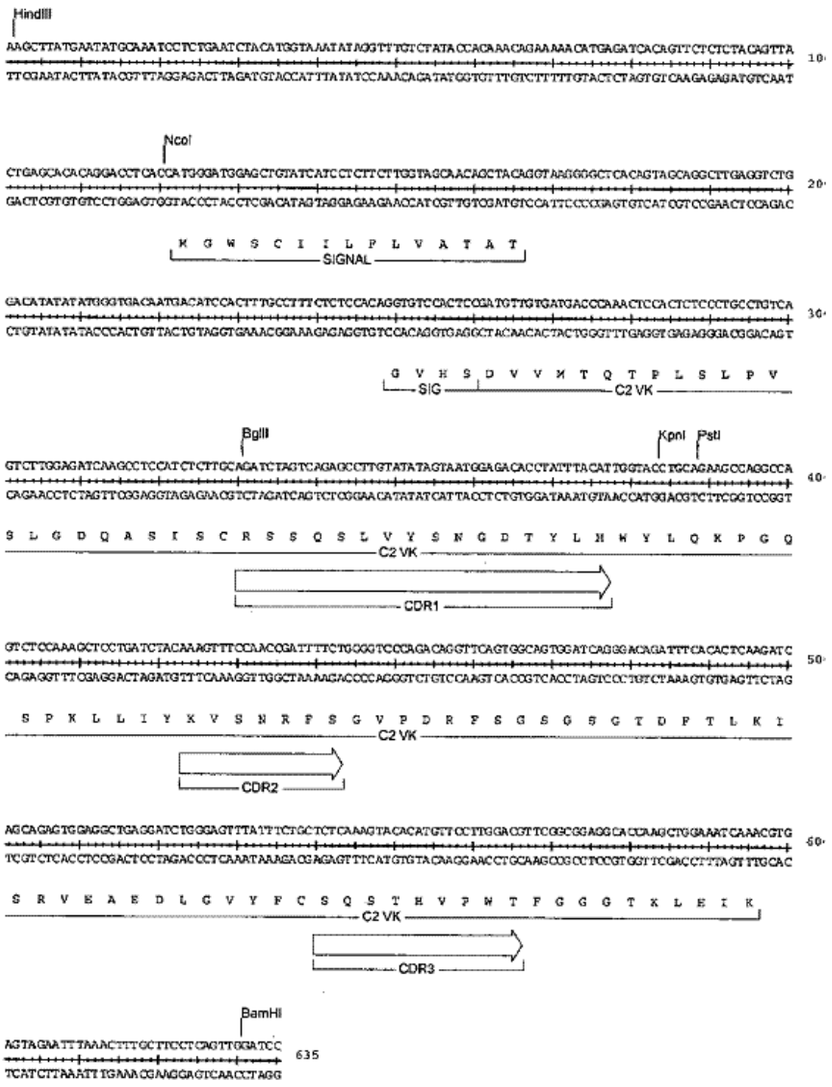
#153087

NOTARIA (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA
CERTIFICO CONFRONTAR QUE LA FOTOCOPIA
COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
08 ENE 2009
MARIA FERNANDA CASAS COLL
NOTARIA ENCARGADA

ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

RESUMEN – OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un anticuerpo quimérico y humanizado y con métodos y composiciones para uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de amiloidosis, un grupo de trastornos y anormalidades asociadas con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.



ANTICUERPO HUMANIZADO CONTRA BETA AMILOIDE

La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para el diagnóstico y el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y anormalidades asociadas con la proteína amiloide tales como la enfermedad de Alzheimer.

La amiloidosis no es una entidad de enfermedad única sino más bien un grupo diverso de procesos de enfermedades progresivas caracterizadas por depósitos en el tejido extracelular de una proteína cerosa semejante a almidón llamada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas corporales. A medida que se acumulan los depósitos de amiloide, éstos comienzan a interferir con la función normal del órgano o del sistema corporal. Existen por lo menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedentes conocidos, la amiloidosis secundaria después de alguna otra condición y la amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria ocurre durante una infección crónica o enfermedad inflamatoria, tal como la tuberculosis, una infección bacteriana llamada fiebre Mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin y lepra.

Los depósitos de amiloide incluyen el componente amiloide P (pentagonal) (AP) , una glicoproteína relacionada con los niveles normales de amiloide P en suero (SAP), y glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), carbohidratos complejos del tejido conectivo. Las fibrillas de proteína amiloide, que representan aproximadamente el 90% del material amiloide, comprenden uno de varios tipos de proteínas diferentes. Estas proteínas se pueden plegar en las llamadas fibrillas de hojas "beta-plegadas", una configuración proteica única que exhibe sitios de unión para el rojo Congo resultando en las propiedades de tinción únicas de la proteína amiloide.

Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la formación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuyen a la patogénesis, así como al avance de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como la enfermedad

de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras, incluyendo degeneración macular.

Si bien la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos con frecuencia contienen muchos constituyentes moleculares compartidos. En gran medida, esto se puede atribuir a la activación local de las vías pro-inflamatorias llevando de este modo a la deposición concurrente de los componentes del complemento activado, reactivos de fase aguda, moduladores inmunes y otros mediadores inflamatorios (McGeer y cols., 1994).

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se considera que es causado principalmente por las placas de amiloides, una acumulación de depósito anormal de proteínas en el cerebro. El tipo de amiloide hallado con mayor frecuencia en el cerebro de los individuos afectados está compuesto principalmente de fibrillas Aβ. Las evidencias científicas demuestran que un incremento en la producción y acumulación de proteína amiloide-beta en las placas conduce a la muerte de la célula nerviosa, lo que contribuye al desarrollo y progresión de la AD. La pérdida de células nerviosas en áreas estratégicas del cerebro, a su vez, ocasiona la reducción de los neurotransmisores y el deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la formación de placas incluyen la proteína precursora de amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora de amiloide (APP), que se expresa de manera constitutiva y es catabolizada en la mayoría de las células por las enzimas β y γ secretasa conduce a la liberación de un péptido Aβ de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las APP probablemente aumenta su propensión a agregarse en placas. Especialmente el fragmento Aβ(1-42) es el que tiene una alta propensión a formar agregados debido a dos residuos de aminoácidos muy hidrofóbicos en su extremo C-terminal. Por consiguiente, se considera que el fragmento Aβ(1-42) está principalmente involucrado y es el responsable de la iniciación de la formación de la placa neurítica en la AD y tiene, en consecuencia, un alto potencial patológico.

Por lo tanto, se necesitan agentes para prevenir la formación de placas amiloides y difundir las placas existentes en AD.

Los síntomas de AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser sólo una pérdida de la memoria leve. En esta etapa, los individuos pueden olvidar eventos recientes, actividades, los nombres de cosas o personas familiares, y pueden no ser capaces de resolver problemas de matemática simples. A medida que la enfermedad avanza, los síntomas se evidencian más fácilmente y se convierten en graves, lo que causa que personas con AD o los miembros de su familia busquen ayuda médica. Los síntomas del estadío medio de AD incluyen el olvido de cómo realizar tareas simples tales como el arreglo personal, y desarrollo de problemas con el lenguaje, comprensión, lectura o escritura. En el estadío tardío de la AD los pacientes se pueden volver ansiosos o agresivos, pueden alejarse del hogar y finalmente necesitan atención total.

En la actualidad, la única manera definida para diagnosticar AD es identificar las placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. En consecuencia, los médicos sólo pueden hacer un diagnóstico "posible" o "probable" de AD mientras la persona aún está viva. Usando los métodos actuales, los médicos pueden diagnosticar la AD de manera acertada hasta el 90 por ciento de las veces empleando diversas herramientas para diagnosticar AD "probable". Los médicos realizan preguntas acerca de la salud general de la persona, problemas médicos del pasado y los antecedentes de cualquier dificultad de la persona para llevar a cabo las actividades diarias. Las pruebas conductuales de memoria, resolución de problemas, atención, cálculo y lenguaje proporcionan información acerca de la degeneración cognitiva y las pruebas médicas tales como exámenes de sangre, orina o líquido espinal y escaneos cerebrales pueden proporcionar alguna información adicional.

El manejo de la AD consiste en tratamientos basados y no basados en medicación. Los tratamientos destinados a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (retardar o revertir el avance) han sido hasta el momento en gran parte infructuosos. Los medicamentos que restauran el déficit (defecto), o mal funcionamiento, de los mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina y rivastigmina, han demostrado mejorar los síntomas. Los ChEI impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores, aumentando la

cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en los estadíos temprano y medio de la enfermedad, los fármacos tacrina (COGNEX®, Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT®, Tokyo, JP), rivastigmina (EXELON®, East Hanover, NJ), o galantamina (REMINYL®, New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir el empeoramiento de algunos síntomas durante un tiempo limitado. Otro fármaco, la memantina (NAMENDA®, New York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de la AD moderada a severa. Las medicaciones están también disponibles para tratar las manifestaciones psiquiátricas de la AD. Adicionalmente, algunas medicinas pueden ayudar a controlar los síntomas conductuales de la AD tales como insomnio, agitación, deambulación errática, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas con frecuencia brinda mayor comodidad a los pacientes y hace más fácil la atención a sus cuidadores. Desafortunadamente, a pesar de los significativos avances del tratamiento que muestran que esta clase de agentes es regularmente mejor que un placebo, la enfermedad continúa su avance y el efecto promedio en el funcionamiento mental solo ha sido modesto. Muchos de los fármacos usados en la medicación de la AD tales como, por ejemplo, los ChEI también tienen efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Otra enfermedad que se basa en o está asociada con la acumulación y depósito de la proteína de tipo amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que causa deterioro de la mácula, que es el área central de la retina (el tejido delgado como un papel en la parte posterior del ojo donde las células sensibles a la luz envían señales visuales al cerebro). La visión ‘frontal’ clara, aguda es procesada por la mácula. El daño en la mácula produce el desarrollo de puntos ciegos y visión distorsionada o borrosa. La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de deterioro visual en los Estados Unidos y para las personas mayores de 65 años es la causa principal de ceguera legal entre los caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de americanos de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia tienen riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que para el 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. Las víctimas de AMD con

frecuencia se sorprenden y frustran al descubrir cuan poco se sabe acerca de las causas y tratamiento de esta condición cegadora.

Existen dos formas de degeneración macular: degeneración macular seca y degeneración macular húmeda. La forma seca, en la cual las células de la mácula comienzan a destruirse lentamente, es diagnosticada en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Usualmente ambos ojos están afectados por la AMD seca, si bien un ojo puede perder la visión mientras que el otro ojo permanece sin afectarse. Los drusen, que son depósitos amarillos bajo la retina, son signos comunes tempranos de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca avanzada o AMD húmeda aumenta a medida que aumenta el número o tamaño de los drusen. Es posible que la AMD seca avance y cause pérdida de visión sin transformarse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible que la AMD seca en estadío temprano cambie de repente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque solo representa el 15 por ciento de los casos, causa el 90 por ciento de las cegueras y se la considera AMD avanzada (no hay estadío temprano ni intermedio de la AMD húmeda). La AMD húmeda es siempre precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas comienzan a tener un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos detrás de la mácula. Estos vasos son muy frágiles y filtrarán líquido y sangre (de aquí degeneración macular 'húmeda'), lo que provoca un daño rápido a la mácula.

La forma seca de la AMD con frecuencia causará inicialmente visión ligeramente borrosa. El centro de la visión en particular puede luego volverse borrosa y esta región crece a medida que la enfermedad avanza. Los síntomas no pueden notarse si solo un ojo está afectado. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden parecer onduladas y se puede producir rápidamente la pérdida de visión central.

El diagnóstico de la degeneración macular involucra de manera típica un examen de ojo dilatado, prueba de agudeza visual y un examen de la parte posterior del ojo mediante un procedimiento llamado examen de fondo de ojo para ayudar a diagnosticar la AMD, y —si se sospecha de la existencia de AMD húmeda— también se puede realizar una angiografía con fluoresceína. Si la AMD seca alcanza los estadíos avanzados, actualmente no existe un tratamiento para

prevenir la pérdida de la visión. Sin embargo, una fórmula específica de altas dosis de antioxidantes y zinc puede retrasar o prevenir que la AMD intermedia evolucione al estado avanzado. El Macugen® (inyección de pegaptanib sodio), fotocoagulación láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, lo cual es de gran ayuda para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se recuperará con estas técnicas. Si la visión ya se ha perdido, existen auxiliares de la visión baja que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los signos más tempranos de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusen entre la lámina basal del epitelio pigmentado retiniano (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes realizados por Anderson y cols., han confirmado que el drusen contiene amiloide beta. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

La investigación en curso continúa con los estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y dietarios que pueden contribuir a la AMD. También se están explorando nuevas estrategias de tratamiento, que incluyen trasplantes de células retínales, fármacos que evitarán o retrasarán el avance de la enfermedad, terapia con radiación, terapias génicas, un chip de computadora implantado en la retina que puede ayudad a estimular la visión y agentes que evitarán el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante para considerar cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso para los pacientes seleccionados. La administración oral, -específicamente comprimidos, cápsulas y geles blandos -, representa el 70% de todas las formas de dosificación consumidas debido a conveniencia del paciente. Los desarrolladores de fármacos concuerdan en que los pacientes prefieren la administración oral más que someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración medicinal. Las formulaciones que dan como resultado bajos intervalos de dosificación (es decir, una vez al día o liberación sostenida) son también preferibles. La facilidad de administrar antibióticos en formas de dosificación oral produce un aumento en el cumplimiento del paciente durante el tratamiento.

Se necesitan métodos y composiciones efectivas para prevenir o dirigidos a las complicaciones asociadas con la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloidea que incluyen la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo de Parkinson-demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio adulto; amiloidois cardíaca senil, tumores endocrinos y, otros, incluyendo degeneración macular. En particular se necesitan agentes capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad tales como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras del péptido amiloide o de tipo amiloide.

Se ha reportado que los anticuerpos antiamiloides elicitados mediante la inoculación de $Aß_{1-42}$ mezclado con adyuvante de Freund completo o incompleto reducen la carga de amiloides en ratones transgénicos para la enfermedad humana de Alzheimer (Schenk y cols., 1999). La inoculación intraperitoneal de $Aß_{1-16}$ tetrapalmitoilado reconstituido en liposomas en ratones transgénicos NORBA elicitó títulos significativos de anticuerpos anti-amiloides, que también demostró poder solubilizar fibras y placas amiloides *in vitro* e *in vivo*. (Nicolau y cols., 2002).

Un mecanismo posible mediante el cual se produce la disolución de placas y fibras amiloides fue sugerido primero por Bard y cols., (2000), quién concluyó que los anticuerpos opsonizaron las placas, que posteriormente fueron destruidas por los macrófagos de la microglia. De Mattos y cols., (2001) indicaron que un mAb dirigido contra el dominio central de amiloide ß fue capaz de unir y secuestrar completamente el plasma amiloide. Ellos sostuvieron que la presencia de estos mAbs en la circulación desplazó el equilibrio de Aß entre cerebro y plasma, favoreciendo la depuración periférica y el catabolismo en vez del depósito dentro del cerebro.

La terapia humana prolongada con anticuerpos de roedor puede resultar en una respuesta de antiglobulina que es detectable cerca de 8-12 días después de la administración y alcanza un pico cerca de 20-30 días. Si se encuentra dicha respuesta de antiglobulina, el tratamiento debe descontinuarse después de no más de 10 días y un re-tratamiento en una fecha posterior usualmente se descarta puesto que llevará a un inicio rápido de una respuesta de antiglobulina. Aunque los anticuerpos de roedores comparten un grado considerable de conservación de secuencias de los anticuerpos humanos, hay muchas diferencias de secuencia entre los anticuerpos de roedores y de humanos, suficiente para que los anticuerpos de roedor sean inmunogénicos en humanos.

Este problema se puede resolver generando anticuerpos directamente en los humanos o mediante la creación de “humanizados” (es decir, anticuerpos “reformados”). Los anticuerpos humanizados tienen una secuencia de aminoácidos con una región variable que contiene las CDRs derivadas de roedor intercaladas en secuencia marco humanas o semejantes a humanas. Dado que la especificidad del anticuerpo humanizado la proveen las CDRs derivadas de roedor, sus residuos se usan esencialmente sin cambio permitiendo sólo modificaciones menores, que no interfieren significativamente con la afinidad y especificidad del anticuerpo por su antígeno objetivo. Los residuos marco pueden derivarse de cualquier primate o, particularmente, de cualquier región variable humana o pueden ser una combinación de los mismos y la región variable resultante designada se consideraría reformada.

Para maximizar la posibilidad de que la afinidad se retenga en el anticuerpo reformado es importante hacer una selección apropiada de la región marco. Se sabe que las secuencias marco sirven para mantener las CDRs en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos marco algunas veces pueden participar incluso en la unión a antígenos. Con el fin de mantener la afinidad del anticuerpo por su antígeno es ventajoso seleccionar secuencias marco humanas que sean más similares a las secuencias de los marcos de roedores. Entonces todavía sería necesario reemplazar uno o más aminoácidos en la secuencia marco humana con el residuo correspondiente en el marco del roedor para evitar pérdidas de afinidad. Se puede usar como ayuda para este reemplazo modelamiento computacional.

.

La presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y efectivos, particularmente anticuerpos quiméricos, incluyendo fragmentos de los mismos, más particularmente anticuerpos humanizados parcialmente o totalmente incluyendo fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a los epítopes específicos a partir de una variedad de antígenos amiloides β, que pueden presentarse al anticuerpo en forma monomérica, dimérica, trimérica, etc, una forma polimérica, en forma de agregado, fibras, filamentos o en la forma condensada de una placa. Los anticuerpos permitidos por las enseñanzas de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides incluyendo amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas a proteínas de tipo amiloide tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandesa, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio adulto; amiloidois cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras, incluyendo la degeneración macular, por nombrar solo unos pocos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio de unión distinto, particularmente a al menos dos sitios de unión distintos, y más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína amiloide-β en donde dicho sitio, dichos al menos dos y dichos al menos tres sitios de unión, comprenden cada uno al menos uno o dos residuos consecutivos de aminoácidos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo.

En particular, el anticuerpo quimérico o el fragmento del mismo, o el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, se une a por

lo menos dos, particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína amiloide-β en donde al menos dos de los tres sitios distintos de unión distintos comprenden al menos dos residuos de aminoácidos involucrados de manera predominante en la unión del anticuerpo y al menos uno de los tres sitios de unión distintos comprende al menos un residuo de aminoácido.

Los al menos dos sitios de unión distintos que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados de manera predominante en la unión del anticuerpo se localizan en proximidad cercana uno al otro en el antígeno, separados y/o rodeados por al menos un residuo de aminoácido que no está involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con dichos al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, formando por consiguiente un epítope conformacional discontinuo.

Los al menos tres distintos sitios de unión que comprenden al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos y al menos un residuo de aminoácido, respectivamente, que están involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, se localizan en proximidad cercana uno al otro en el epítope, separados y/o rodeados por al menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o que lo está en una medida significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos, que están involucrados de forma predominante en la unión al anticuerpo, formando por consiguiente un epítope conformacional discontinuo.

En particular, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios distintos de unión en la proteína amiloide-β, en donde dicho por lo menos uno o dichos por lo menos dos sitios de unión distintos, comprenden cada uno al menos dos residuos consecutivos de aminoácidos involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, en donde, los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos representan un primer sitio de unión son –Phe-Phe- incluidos dentro de la siguiente secuencia nuclear (SEC ID No.: 9):

$–Xaa_3 – Phe- Phe -Xaa_4- Xaa_5 – Xaa_6$, en donde

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6 no están involucrados en la unión a anticuerpos o lo están en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión -Phe-Phe-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es Glu o Asp, pero particularmente Asp;

En particular, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios distintos de unión, más particularmente a por lo menos tres sitios distintos de unión distintos en la proteína amiloide-β en donde dichos sitios distintos de unión comprenden al menos uno y al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son –Phe-Phe- y al menos un residuo de aminoácido es –His- incluida dentro de la siguiente secuencia nuclear:

$-Xaa_1$–His- Xaa_3 –Xaa_4- Xaa_5 – Xaa_6 - Phe- Phe – Xaa_7 – Xaa_8 – Xaa_9 -,

en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile

Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu e Ile

Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_9 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_1, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8 y Xaa_9, no están involucrados en la unión a anticuerpos o lo están en un punto más pequeño o significativamente más pequeño en comparación con el sitio de unión –His- y –Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_3 es Gln o Asn, particularmente Gln;

Xaa_4 es Lys,

Xaa_5 es Leu,

Xaa_6 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_7 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_8 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_9 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres distintos sitios de unión en la proteína amiloide-β, en donde dichos uno o por lo menos dos sitios de unión distintos, comprenden cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos predominantemente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde los por lo menos dos residuos consecutivos de aminoácidos que representan un segundo sitio de unión son –Lys-Leu- incluidos en la siguiente secuencia nuclear (SEC ID No.: 10):

-Xaa_1–Xaa_2 –Lys- Leu- Xaa_3 en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile; y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, no están involucrados en la unión del anticuerpo o lo están en una medida significativamente menor en comparación con el sitio de unión Lys-Leu.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína amiloide β en donde dicho sitio de unión distinto comprende por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos respectivamente, involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, donde por lo menos uno y por lo menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácidos involucrados predominantemente en la unión del anticuerpo son -His- y –Lys-Leu-, respectivamente, incluidos dentro de la siguiente secuencia nuclear:

– His – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3– Xaa_4– Xaa_5–Xaa_6- – Xaa_7 – Xaa_8 –

En donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_7 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_8 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp

Y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_2, Xaa_3, Xaa_6, Xaa_7, Xaa_8 no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida menor hasta significativamente menor en comparación con el sitio de unión de –His- y –Lys-Leu-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo,

en donde

Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Phe

Xaa_5 es Phe

Xaa_6 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_7 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_8 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína amiloide- β en donde dichos al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, en donde por lo menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor que dichos residuos consecutivos de aminoácidos, que son –Phe-Phe- y –Lys-Leu-, respectivamente, representando un primer y un segundo sitio de unión incluidos dentro de la siguiente secuencia nuclear:

$– Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – Xaa_6 –$

En donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln Lys, y Arg;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp y en donde dichos residuos de aminoácidos Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6 no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una medida menor o significativamente menor en comparación con el sitio de unión –Lys-Leu- y –Phe-Phe, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a por lo menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a por lo menos tres sitios de unión distintos en la proteína amiloide- β en donde dichos sitios distintos de unión comprenden por lo menos un residuo de aminoácido y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, en donde los al menos uno y al menos dos aminoácidos están separados en por lo menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor en comparación con los residuos de aminoácido, que están involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, y en donde dichos residuos de aminoácido son –His- y –Phe-Phe- y –Lys-Leu-, respectivamente, incluidos dentro de la siguiente secuencia nuclear:

–His – Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – Xaa_6 –,

En donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp,

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6 no están involucrados en la unión del anticuerpo o lo están en una medida menor o significativamente menor en comparación con los sitios de unión de –His, –Lys-Leu- y –Phe-Phe, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_6 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína amiloide-β en donde dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden, cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo en donde los por lo menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un residuo de aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una medida significativamente menor que dichos residuos consecutivos de aminoácidos, que son –Phe-Phe- y -Lys-Leu, respectivamente, representando un primer y segundo sitios de unión incluidos dentro de la siguiente secuencia nuclear:

Xaa_1 - Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – $Xaa_{6,}$ en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Ala, Leu, Met, Phe, norleucina e Ile;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6, no están involucrados en la unión al anticuerpo en una medida menor o significativamente menor en comparación con los sitios de unión –Lys- Leu- y –Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde

Xaa_1 es His o Arg, pero particularmente His;

Xaa_2 es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa_4 es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa_6 es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En una realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína amiloide- β en donde dichos al menos dos sitios distintos de unión comprenden cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, que son –Phe – Phe – Ala – Glu -, particularmente –Phe – Phe – Ala -, pero especialmente –Phe – Phe – y – Lys – Leu -, respectivamente, y en donde dichos al menos dos sitios distintos de unión exhiben la secuencia de aminoácidos – Val – Phe – Phe – Ala – Glu – Asp – que se muestra en la SEC ID No.: 7 y la secuencia de aminoácidos His – Gln – Lys – Leu – Val – que se muestra en la SEC ID No.: 8, respectivamente.

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une a por lo menos un sitio de unión distinto, particularmente a al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente a al menos tres sitios distintos de unión en la proteína amiloide- β, en donde dicho por lo menos uno o dichos al menos dos sitios distintos de unión comprenden por lo menos uno y por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos, respectivamente,

involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, que son –Phe – Phe – y –Lys – Leu -, e –His-, respectivamente, en donde dicho sitio de unión distinto es introducido en la secuencia de aminoácidos – Val – Phe – Phe – Ala – Glu -, y secuencia de aminoácidos –His–Gln–Lys–Leu–Val-, respectivamente.

En otra realización de la invención, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende el reconocimiento de un antígeno y sitio de unión que reconoce y se une a por lo menos dos sitios de unión distintos en la proteína amiloide-β en donde dichos por lo menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos dada en las SEC ID No.: 7 y 8, respectivamente, en donde dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente –Phe- Phe- y –Lys-Leu-, están involucrados de forma predominante en la unión de la proteína amiloide-β.

En una realización adicional específica de la invención, se proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, que se une a 4 sitios de unión distintos de la proteína amiloide-β en donde dichos 4 sitios de unión distintos incluyen 2 sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y 2 sitios de unión que comprenden cada uno dos residuos de aminoácidos consecutivos, tales residuos están involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo, en donde dichos 4 sitios de unión distintos están localizados en estrecha proximidad entre sí en la proteína amiloide-β, y en donde dichos 4 sitios de unión están separados mediante por lo menos un residuo de aminoácido que no está involucrado en la unión del anticuerpo o involucrado en la unión pero en una medida significativamente menor en comparación con dicho residuo de un aminoácido y dichos dos residuos de aminoácidos consecutivos de los 4 sitios de unión distintos formando de este modo un epítope discontinuo conformacional.

En particular, el primero de los dos residuos de aminoácidos consecutivos involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo es –Lys-Leu-, y el segundo de los por lo menos dos residuos de aminoácidos consecutivos es –Phe-Phe-, el primero de los residuos únicos de aminoácido es -His- y el segundo de los residuos únicos de aminoácido es -Asp- incluido dentro de la siguiente secuencia nuclear:

– Xaa_1 – His – Xaa_2 – Lys – Leu- Xaa_3– Phe- Phe- Xaa_4– Xaa_5–Asp- Xaa_6– en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero particularmente His;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile, particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile, particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, particularmente Val; y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_1, Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5, Xaa_6, no están involucrados en la unión al anticuerpo o están involucrados en la unión pero en una medida significativamente menor en comparación con los sitios de unión –His-, -Asp-, -Lys- Leu-, y –Phe-Phe-.

En una realización, la invención se relaciona con un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, que se une a 4 sitios de unión distintos en la proteína amiloide-β, en donde dichos 4 sitios de unión distintos incluyen dos sitios de unión que comprenden cada uno un residuo de aminoácido y dos sitios de unión donde cada uno comprende dos residuos de aminoácido consecutivos, en donde el primero de los dos residuos consecutivos de aminoácido involucrados de forma predominante en la unión del anticuerpo es –Lys-Leu-, y el segundo de los al menos dos residuos de aminoácidos consecutivos es -Phe-Phe-, el primero de los residuos de aminoácido solos es –His- y el segundo de los residuos de aminoácido solos es –Asp- incluido dentro de la siguiente secuencia nuclear:

– Xaa_1 – His – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3– Phe- Phe- Xaa_4– Xaa_5– Asp- Xaa_6- en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, Lys y Arg, pero particularmente His;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile, particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, Ser e Ile, particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile, particularmente Val: y en donde dichos residuos de aminoácidos $Xaa_{1,}$ $Xaa_{2,}$ Xaa_3, $Xaa_{4,}$ $Xaa_{5,}$ $Xaa_{6,}$ no están involucrados en la unión del anticuerpo o están involucrados en la unión pero en una medida significativamente menor en comparación con los sitios de unión –His-, –Asp-, -Lys-Leu, y –Phe-Phe-.

En una realización específica de la invención, los sitios de reconocimiento y unión como se definió anteriormente aquí están formando un epítope conformacional discontinuo localizado en una región de la proteína amiloide-β entre los residuos de aminoácidos 12 a 24, particularmente entre los residuos 14 a 23, más particularmente entre los residuos de aminoácidos 14 y 20, en donde los por lo menos dos sitios de reconocimiento distinto y unión que comprenden cada uno por lo menos 2 residuos de aminoácidos, están localizados en las posiciones 16 y 17, y en las posiciones 19 y 20, respectivamente, y en donde el por lo menos un sitio de reconocimiento y unión distinto que comprende al menos 1 residuo de aminoácido se localiza en la posición 14, tales residuos están involucrados de forma predominante en la unión de la proteína amiloide –β y en donde dichos sitios de reconocimiento y unión distintos están rodeados al menos en un lado por residuos de aminoácidos, particularmente residuos 21 y 22, y separados por un residuo de aminoácido localizado en las posiciones 15 y 18, residuos de aminoácido que no están directamente involucrados en la unión del antígeno o, al menos, en una medida sustancialmente menor.

Incluso en otra realización de la invención, los dichos por lo menos tres sitios distintos de reconocimiento y unión están rodeados en ambos lados por residuos de aminoácidos, particularmente los residuos 12 y 13, y los residuos 21 y 22 y están separados por un residuo de aminoácido localizado en la posición 15 y 18, residuos de aminoácido que no están involucrados directamente en la unión del antígeno o, por lo menos, en una medida sustancialmente menor.

En una realización específica, dichos residuos de aminoácidos consecutivos, particularmente –Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y –Phe- Phe- en las posiciones

19 y 20, los cuales están involucrados de forma predominante en la unión de la proteína amiloide-β, están incluidos en la siguiente región del núcleo:

Val–	His–	His–	Gln–	Lys–	Leu–	Val–	Phe–	Phe–	Ala–	Glu–	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

En otra realización específica, dichos residuos de aminoácidos, particularmente –Lys-, -Leu- en las posiciones 16 y 17 y -Phe-Phe- en las posiciones 19 y 20, e –His- en la posición 14, los cuales están involucrados de forma predominante en la unión de la proteína amiloide-β, están incluidos en la siguiente región del núcleo:

Val–	His–	His–	Gln–	Lys–	Leu–	Val–	Phe–	Phe–	Ala–	Glu–	Asp–	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

En otra realización de la invención, se provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de la cadena ligera y cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no-humano, particularmente dos CDR de origen no-humano, más particularmente tres CDR de origen no-humano, incluidas en una o más regiones marco derivadas de humano o primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente a la proteína amiloide-β, particularmente un péptido monomérico amiloide-β, más particularmente un péptido polimérico amiloide-β-, incluso más particularmente fibras, fibrillas o filamentos amiloides-β aislados o como parte de una placa amiloide-β, en un epítope que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID No.: 11);

– Xaa_1 – Xaa_2 – Lys – Leu –Xaa_3 – Phe – Phe – Xaa_4 – Xaa_5 – Xaa_6 – en donde

Xaa_1 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de His, Asn, Gln, pero particularmente His;

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Leu e Ile, pero particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala y Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Asp;

Incluso en otra realización de la invención, se provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente, por lo menos una CDR de origen no-humano, particularmente dos CDRs de origen no-humano, más particularmente tres CDR de origen no-humano, incluidos en una o más regiones marco derivadas de humano -o primate- y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o primate, cuyo anticuerpo humanizado o fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente a la proteína amiloide-β, particularmente un péptido monomérico amiloide-β, más particularmente un péptido polimérico amiloide-β, incluso más particularmente fibras, fibrillas o filamentos amiloides-β aislados o como parte de una placa amiloide-β, en un epítope que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

– His – Xaa_2 – Lys – Leu – Xaa_3– Phe- Phe- Xaa_4– Xaa_5–Xaa_6-

En donde

Xaa_2 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Asn y Gln, pero particularmente Gln;

Xaa_3 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Val, Leu e Ile, pero particularmente Val;

Xaa_4 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Ala y Val, pero particularmente Ala;

Xaa_5 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa_6 es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste de Glu y Asp, pero particularmente Glu; y en donde dichos residuos de aminoácido Xaa_2, Xaa_3, Xaa_4, Xaa_5 y Xaa_6, no están involucrados en la unión al anticuerpo en una medida menor en comparación con el sitio de unión –His-, y–Lys- Leu- y–Phe-Phe-.

En una realización específica de la invención, la CDR de origen no-humano se obtiene a partir de un anticuerpo donor, pero particularmente a partir de un anticuerpo donor murino, que se origina contra un fragmento del antígeno que no contiene dicho sitio de unión distinto. Este cambio en la región epitópica puede haber sido causado al menos parcialmente por el uso de una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde

a la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide-β, particularmente del péptido amiloide-β $A\beta_{1-16}$, modificado con un residuo hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicho fragmento hidrofílico está unido de manera covalente a cada uno de los términos del péptido antigénico mediante al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o aminoácido análogo capaz de servir como un dispositivo conector para acoplar el fragmento hidrofílico al fragmento del péptido como se describe aquí a continuación en el proceso de inmunización. Cuando se usa un PEG como fragmento hidrofílico, los términos de PEG libres están unidos en forma covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma como se describe aquí.

En particular, la CDR de origen humano se obtiene a partir de un anticuerpo donor murino que exhibe las propiedades características de ACI-01-Ab7C2 (también llamado “mC2” a lo largo de la solicitud) depositado en Diciembre 01 de 2005 con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest bajo el No. de acceso DSM ACC2750).
En una realización de la invención, la CDR de origen no-humano se obtiene a partir del anticuerpo donor murino ACI-01-Ab7C2 (también llamado “mC2” a lo largo de la solicitud) depositado en Diciembre 01 de 2005 con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest bajo el No. de acceso DSM ACC2750).

Asimismo, el uso del lípido A como parte del protocolo de inmunización puede haber contribuido al cambio en la región epitópica.

En una realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en regiones marco derivadas de humanos o primates, por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de la SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y la SEC ID No.: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEC ID No.: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en regiones marco de cadena pesada derivadas del humano o primate, por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende integrado en regiones marco de cadena liviana derivadas del humano o primate integradas en por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) que comprende regiones marco derivadas de humano -o primate- integradas en por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No.: 4 que representa CDR1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integradas en las regiones marco derivadas de humano -o primate- en por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 2, que representa el CDR2 y la SEC ID No.: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

La invención se relaciona adicionalmente con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integradas en regiones marco derivadas de humano o primate por lo menos dos péptidos, cuyos péptidos son diferentes y exhiben una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEC ID No.: 1, que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa la CDR2 y la SEC ID No.: 6 que la CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) en donde el mismo CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo. En particular, si los por lo menos dos CDRs presentes son

CDRs de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), por lo menos una de dichas CDRs debe ser CDR1 representada mediante la SEC ID No.: 4.

Asimismo, la invención comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integradas en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integradas en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En una realización adicional, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integradas en regiones marco de cadena liviana derivadas de humano -o primate- por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), tiene integrado en regiones marco de cadena liviana derivadas de humano o primate por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 representa CDR3 en la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo y, en particular, por lo menos una de dichos CDR, debe ser CDR1 representada por SEC ID No.: 4.

La invención también se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, la SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y la SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende integrada en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

La invención también comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende integradas en regiones marco de cadena liviana derivadas de humano o primate en péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), que comprende integrada en regiones marco de cadena liviana derivadas de humano o primate con una secuencia de aminoácidos de de SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

La invención también se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en regiones marco derivadas de humano o primate por lo menos tres péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEC ID No.: 1 que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), pero

particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

En otra realización la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, anticuerpo que comprende integrado en regiones marco derivadas de humano o primate al menos cuatro péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, la SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en regiones marco derivadas de humano o primate por lo menos cinco péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en SEC ID No.: 1 que representa CDR1, la SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que comprende integrado en regiones marco derivadas de humano o primate integradas en péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1, SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3, que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEC ID No.: 4 que representa CDR1, SEC ID No.: 5 que representa CDR2 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En una realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de

la misma, en donde dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento del mismo comprende integrado en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano -o primate- por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano -o primate- integradas en por lo menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo humanizado, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate integradas en por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1 y SEC ID No.: 2 que representa CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano -o primate- integradas en por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1 y SEC ID No.: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo, Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano -o primate- integradas en por lo menos dos péptidos con

una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 y SEC ID No.: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo, Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano -o primate- integradas en por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1 y SEC ID No.: 5 que representa CDR2 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En otra realización específica, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Liviana (LCVR), o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo, Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) o fragmento de la misma comprende regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate integradas en por lo menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1 y SEC ID No.: 6 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

Adicionalmente la invención comprende un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) del anticuerpo de ratón C2, contribuyen cada una en por lo menos una de sus regiones CDR al menos dos regiones CDR del anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado resultante de un fragmento de las mismas puede comprender, por consiguiente:

-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1 (LCVR);

-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1 (LCVR);

-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 4 que representa CDR1 (LCVR);

-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 5 que representa CDR2 (LCVR);

-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 5 que representa CDR2 (LCVR);
-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 2 que representa CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 6 que representa CDR3 (LCVR);
-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 1 que representa CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 6 que representa CDR3 (LCVR);
-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 5 que representa CDR2 (LCVR);
-Por lo menos una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 3 que representa CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de SEC ID No.: 6 que representa CDR3 (LCVR);

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describió aquí anteriormente, cuyo anticuerpo comprende una región constante de cadena liviana y/o pesada de origen humano o primate.

En una realización adicional, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde por lo menos uno, particularmente por lo menos uno pero no más de 5, más particularmente por lo menos uno pero no más de 4, incluso más particularmente pero no más de 3, pero especialmente al menos uno pero no más de 2, de los aminoácidos representativos de las regiones CDR de cadena liviana y/o pesada como se da en las SEC ID No.: 1- 6 se cambia a través de una sustitución conservativa de modo que el anticuerpo mantiene su funcionalidad total.

En particular, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la CDR2 de la región variable de cadena liviana (LCVR) como se da en la SEC ID No.: 5, la Lys en la posición Kabat 50 se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente con Arg.

En particular, la invención se relaciona con una región variable de cadena liviana (LCVR) en donde en la CDR2 como se da en la SEC ID No.: 5, la Lys en la posición Kabat 50 se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente con Arg.

En otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la CDR2 de la región variable de cadena liviana (LCVR) como se da en la SEC ID No.: 5, la Ser en la posición Kabat 53 se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente con Asn.

En particular, la invención se relaciona con una región variable de cadena liviana (LCVR) en donde en la CDR2 como se da en la SEC ID No.: 5, la Ser en la posición Kabat 53 se reemplaza con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente con Asn.

En una realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la secuencia dada en SEC ID No.: 15 y 16, respectivamente.

En otra realización de la invención, un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la secuencia dada en SEC ID No.: 12 y 13, respectivamente.

Incluso en otra realización de la invención, se provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde por lo menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la secuencia dada en SEC ID No.: 1 y 3.

En una realización adicional de la invención, se provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde por lo menos dos, pero especialmente tres,

de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, particularmente 95%, más particularmente 98% idéntica a la correspondiente región CDR dada en SEC ID No.: 4-6.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe aquí anteriormente, en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en SEC ID No.: 15 y 16, respectivamente.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe aquí anteriormente, en donde la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia dada en SEC ID No.: 12 y 13, respectivamente.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe aquí anteriormente, en donde al menos uno, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la correspondiente región CDR como se da en SEC ID No.: 1- 3.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención como se describe aquí anteriormente, en donde al menos uno, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la correspondiente región CDR como se da en SEC ID No.: 4-6.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención y como se describió aquí, en donde al menos uno de los aminoácidos representativos de las secuencias de marco aceptoras obtenidas a partir de las secuencias germinales humanas V_H y V_K, respectivamente se cambia a través de la sustitución a un aminoácido a partir de la región correspondiente de anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 o una sustitución conservativa a ésta.

En particular, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y a un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu tal como se muestra en SEC ID NO: 15.

La invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia marco aceptora obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente con Ser tal como se muestra en la SEC ID No.: 15.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia marco aceptora obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu y Ile, pero especialmente con Leu y el Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza con

un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente Ser tal como se muestra en la SEC ID No.: 15.

La invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Liviana y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Liviana, respectivamente, en donde el Gln en la posición Kabat 45 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_k del subgrupo KABAT V_kII de la Región Variable de Cadena Liviana se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln y Asn, particularmente por Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

La invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Liviana y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Liviana, respectivamente, en donde la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_k del subgrupo KABAT V_kII de la Región Variable de Cadena Liviana se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

La invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Liviana y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Liviana, respectivamente, en donde el Lys en la posición Kabat 50 en la región CDR2 obtenida del anticuerpo monoclonal de un ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, tal como se muestra en la SEC ID No.: 12 es reemplazada por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente por Arg.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Liviana y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Liviana, respectivamente, en donde el Asn en la posición Kabat 53 en la región CDR2 obtenida del anticuerpo monoclonal de un ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, tal como se muestra en la SEC ID No.: 12 es reemplazada por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser, Ile; pero especialmente Ser.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia marco aceptora obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente con Ser tal como se muestra en la SEC ID No.: 15, y la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_K del subgrupo KABAT V_KII de la Región Variable de Cadena Liviana se reemplaza con una aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile y Ala, particularmente con Leu y Phe, pero especialmente con Phe.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Leu tal como se muestra en la SEC ID No.: 15.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Ser tal como se muestra en la SEC ID No.: 15.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona adicionalmente con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia de marco aceptor obtenida a

partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Ser tal como se muestra en la SEC ID No.: 15.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Liviana y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Liviana, respectivamente, en donde la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_K del subgrupo KABAT V_kII de la Región Variable de Cadena Liviana se reemplaza con Phe.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y a un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con Ser tal como se muestra en SEC ID No.: 15 y la Tyr en la posición Kabat 87 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_K del subgrupo KABAT V_KII de la Región Variable de Cadena Liviana se reemplaza con Phe.

En una realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y a un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente con Ser tal como se muestra en SEC ID No.: 15 y en donde la Lys en la posición Kabat 50 en la región CDR2 obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se reemplaza con un

aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, His, y Asn, pero especialmente con Arg.

En una realización, la invención se relaciona con una Región Variable de Cadena Pesada y con un anticuerpo humanizado que comprende esta Región Variable de Cadena Pesada, respectivamente, en donde el Trp en la posición Kabat 47 en la secuencia de marco aceptor obtenida a partir de las secuencias germinales humanas V_H del subgrupo KABAT V_HIII de la Región Variable de Cadena Pesada se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu y la Arg en la posición Kabat 94 se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente con Ser tal como se muestra en SEC ID No.: 15 y en donde la Asn en la posición Kabat 53 en la región CDR2 obtenida a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se reemplaza con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile; pero especialmente Ser.

En una realización especifica, la invención se relaciona con la región variable de cadena liviana de la SEC ID No.: 12.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, el cual comprende la región variable de cadena liviana de la SEC ID No.: 12.

En una realización especifica, la invención se relaciona con la región variable de cadena liviana de la SEC ID No.: 13.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, el cual comprende la región variable de cadena liviana completa de la SEC ID No.: 13.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena liviana de la SEC ID No.: 12 y la región constante de cadena liviana de la SEC ID No.: 14.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena liviana completa de la SEC ID No.: 13 y la región constante de cadena liviana de la SEC ID No.: 14.

En una realización especifica, la invención se relaciona con la región variable de cadena pesada de la SEC ID No.: 15.

En otra realización especifica de la invención se provee un anticuerpo humanizado, el cual comprende la región variable de cadena pesada de la SEC ID No.: 15.

En otra realización específica de la invención, la invención se relaciona con la región variable de cadena pesada incluyendo secuencias señal como se muestra en la SEC ID No.: 16.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada incluyendo secuencias señal tal como se muestra en la SEC ID No.: 16.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada de la SEC ID No.: 15 y la región constante de cadena pesada de la SEC ID No.: 17.

En otra realización específica de la invención, se provee un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada de la SEC ID No.: 16 y la región constante de cadena pesada de la SEC ID No.: 17.

En una realización el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención y como se describe aquí, mediante co-incubación con un péptido Aβ monomérico que tenía por lo menos 30, particularmente por lo menos 35, más particularmente por lo menos 38, incluso más particularmente por lo menos 40 residuos de aminoácidos y/o un péptido amiloide polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades Aβ monoméricas, pero especialmente con un péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ monomérico y/o Aβ amiloide polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monoméricas de $A\beta_{1-42}$, particularmente a una razón de concentración molar de anticuerpo a $A\beta_{1-42}$ de hasta 1:1000, particularmente de hasta 1:500, más particularmente de hasta 1:300, incluso más particularmente de hasta 1:200, pero especialmente a una

razón de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, inhibe la agregación de los monómeros Aβ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

En particular, la co-incubación del anticuerpo de acuerdo con la invención con péptidos amiloides monoméricos y/o poliméricos solubles se lleva a cabo durante 24 horas a 60 horas, particularmente durante 30 horas hasta 50 horas, más particularmente durante 48 horas, pero especialmente 24 horas, a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En una realización específica de la invención, la co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y/o poliméricos solubles se lleva a cabo durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

En particular, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención, incluyendo cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o partes funcionales del mismo se une al péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ monomérico y/o Aβ polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monoméricas de $A\beta_{1-42}$ y, mediante la co-incubación con el péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ monomérico y/o Aβ polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monomérica de dicho $A\beta_{1-42}$ inhibe la agregación de los Aβ monómeros y/o polímeros a fibrillas poliméricas de alto peso molecular.

.

En una realización, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención incluyendo cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o partes funcionales del mismo, inhibe la agregación de los Aβ monómeros y/o Aβ polímeros solubles que comprenden una pluralidad de dichas unidades monoméricas de Aβ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular mediante por lo menos 50%, particularmente mediante por lo menos 60%, particularmente mediante por lo menos 65%, más particularmente mediante por lo menos 75%, incluso más particularmente mediante por lo menos 80%, pero especialmente mediante por lo menos 85%-90%, o más en comparación con los monómeros del péptido amiloide respectivos incubados en amortiguador (control), a una razón de concentración molar del anticuerpo $A\beta_{1-42}$ de hasta 1:1000, particularmente a una razón de concentración molar entre 1:10 y 1:100, pero especialmente a una razón de concentración molar de 1:10.

En una realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de Aβ monómeros y/o Aβ polímeros solubles que comprenden una pluralidad de dichas Aβ unidades monoméricas a fibrillas poliméricas de alto peso molecular mediante por lo menos 30% a una razón de concentración molar de anticuerpo a $A\beta_{1-42}$ de 1:100.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de Aβ monómeros y/o Aβ polímeros solubles que comprenden una pluralidad de dichas unidades monoméricas de Aβ a fibrillas poliméricas de alto peso molecular mediante por lo menos 80% a una razón de concentración molar de anticuerpo a $A\beta_{1-42}$ de 1:10.

La unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y como se describe aquí a péptidos monoméricos y/o poliméricos amiloidogénicos pero, particularmente, a la forma amiloide (1-42) lleva a la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos y/o poliméricos amiloidogénicos a fibrillas o filamentos de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de péptidos monoméricos y/o poliméricos amiloidogénicos los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de prevenir o retardar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), la cual es conocida al convertirse insoluble mediante el cambio de la conformación secundaria y que es la parte mayoritaria de las placas amiloides en los cerebros de animales o humanos enfermos.

El potencial de inhibición de agregación del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede determinar mediante cualquier método apropiado conocido en el arte, particularmente mediante ultracentrifugación por gradiente de densidad seguida por análisis de sedimentación con SDS-PAGE sobre un gradiente preestablecido y/o mediante un ensayo con tioflavina T (Th-T) fluorescente.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado como se describe aquí, que incluye cualquier anticuerpo equivalente funcionalmente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo,

mediante incubación, particularmente a una razón de concentración molar de entre 1:5 y 1:1000, particularmente de entre 1:10 y 1:500, más particularmente a una razón de 1:10 a 1:300, incluso más particularmente a una razón de entre 1:10 y 1:100, con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular formados mediante la agregación de péptidos Aβ monoméricos que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente por lo menos 40 residuos de aminoácidos y, pero especialmente los péptidos monoméricos $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos poliméricos preformados en por lo menos 20% particularmente en por lo menos 30%, más particularmente en por lo menos 35%, incluso más particularmente en por lo menos 40%, pero especialmente en por lo menos 50% o más.

En una realización específica de la invención, la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan mediante ultracentrifugación por gradiente de densidad seguida por análisis de sedimentación con SDS-PAGE sobre un gradiente preestablecido.

En otra realización específica de la invención, la inhibición de la agregación y el potencial de desagregación del anticuerpo, respectivamente, se determinan mediante un ensayo con tioflavina T (Th-T) fluorescente.

En otra realización específica, el anticuerpo de acuerdo con la invención se co-incuba con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular amiloides preformados durante 12 horas hasta 36 horas, particularmente durante 18 horas hasta 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura entre 28°C y 40°C, particularmente entre 32°C y 38°C, más particularmente a 37°C.

En particular, la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular preformados se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

En una realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados en por

lo menos 24% en una razón de concentración molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados en por lo menos 32% en una razón de concentración molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:10.

Mediante la desagregación de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloidogénicos los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son capaces de impedir o disminuir la formación de placas amiloides que conducen a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retraso o reversión de su avance.

En concordancia, es una realización adicional de la invención proveer un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe aquí, anticuerpo que es capaz de disminuir la cantidad total de Aβ en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece de una enfermedad o condición que conduce a una concentración aumentada de Aβ en el cerebro.

En otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención y como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo que es bi-efectivo puesto que exhibe una propiedad de inhibición de la agregación además de la propiedad de desagregación, particularmente apareado con un alto grado de sensibilidad conformacional.

En particular, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la invención y como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo que mediante co-incubación con péptidos amiloides monoméricos y/o poliméricos solubles, particularmente con péptidos β amiloides monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos Aβ monoméricos 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, y/o un péptido β amiloide polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monoméricas Aβ, pero

especialmente con un péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ monomérico y/o un péptido amiloide Aβ polimérico soluble, que comprende una pluralidad de dichas unidades $A\beta_{1-42}$ monoméricas, inhibe la agregación de Aβ monómeros en fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular y, adicionalmente, mediante co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides poliméricos de alto peso molecular formados mediante la agregación de péptidos monoméricos, particularmente péptidos amiloides β monoméricos tales como, por ejemplo, los péptidos monoméricos Aβ 1-39; 1-40, 1-41, o 1-42, pero especialmente péptidos $A\beta_{1-42}$ monoméricos, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo es capaz de inducir una transición de la conformación de hoja β hacia una conformación de hélice α y/o de enrollamiento al azar, pero particularmente una conformación de enrollamiento al azar, incluso más particularmente una conformación de enrollamiento al azar en una localización determinada en la molécula, especialmente en el ambiente de Tyr 10 y Val12 de la proteína Aβ, que conduce a un aumento de la conformación de arrollamiento al azar a expensas de la conformación de hoja β y una solubilización mejorada de las fibrillas o filamentos poliméricos amiloides de alto peso molecular preformados. En particular, la disminución de la conformación hoja β llega a por lo menos 30%, particularmente a por lo menos 35%, y más particularmente a por lo menos 40% y más en comparación con las fibrillas o filamentos amiloides poliméricos preformados respectivos incubados en amortiguador (control).

El potencial del anticuerpo para inducir una transición de la estructura secundaria se determina por espectroscopia RMN-^{13}C en estado sólido pero, en particular, por la medición de las intensidades integrales de las conformaciones de Tyr 10 y Val 12 Cβ en el péptido $A\beta_{1-42}$.

En una realización adicional de la invención se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención y como se describe aquí anteriormente, que comprende al menos una cadena liviana o un fragmento de la misma o por lo menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde dicho

anticuerpo o fragmento se une a un Aβ monómero con una alta afinidad de unión con K_D en el rango de entre por lo menos 1 x 10^{-7} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-12} M aproximadamente, particularmente de por lo menos 1 x 10^{-8} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-11} M aproximadamente, más particularmente de por lo menos 1 x 10^{-9} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-10} M aproximadamente, incluso más particularmente de por lo menos 1 x 10^{-8} M aproximadamente a por lo menos por lo menos 2 x 10^{-8} M pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

En otra realización de la invención se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención y como se describe aquí anteriormente, que comprende al menos una cadena liviana o un fragmento de la misma, o por lo menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo o fragmento se une a una fibra, fibrilla o filamento Aβ con una alta afinidad de unión con K_D en el rango de entre por lo menos 1 x 10^{-7} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-12} M aproximadamente, particularmente de por lo menos 1 x 10^{-8} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-11} M aproximadamente, más particularmente de por lo menos 1 x 10^{-9} M aproximadamente a por lo menos 1 x 10^{-10} M aproximadamente, incluso más particularmente de por lo menos 2 x 10^{-9} M aproximadamente a por lo menos por lo menos 5 x 10^{-9} M pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención o un fragmento del mismo, exhibe una afinidad de unión a una fibra, fibrilla o filamento Aβ que es por lo menos 2 veces, particularmente por lo menos 4 veces, particularmente por lo menos 10 veces, particularmente por lo menos 15 veces, más particularmente por lo menos 20 veces, pero especialmente por lo menos 25 veces mayor que la afinidad de unión a un Aβ monómero.

Incluso en otra realización, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo que se une sustancialmente a Aβ ,agregada incluyendo placas Aβ, en el mamífero, particularmente el cerebro humano pero

preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

En otro aspecto de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo que se une sustancialmente al amiloide polimérico soluble, particularmente amiloide β (Aβ), incluyendo Aβ monómeros, en el mamífero, particularmente el cerebro humano pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora de amiloide (APP).

Se provee adicionalmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención y como se describe aquí anteriormente, el anticuerpo que reduce significativamente la carga de la placa Aβ en el mamífero, particularmente el cerebro humano. Esto se puede lograr ya sea mediante la unión del anticuerpo a la placa o por cambio del equilibrio entre el amiloide, particularmente amiloide β (Aβ), en su estado insoluble y agregado hacia su forma soluble, desagregando fibras a formas poli- y monoméricas solubles mediante la inducción de un cambio en la conformación y unión y estabilizando las formas amiloides desagregadas y solubilizadas, particularmente formas de amiloide β (Aβ), en el tejido y/o fluidos corporales, particularmente el cerebro. Mediante la actividad del anticuerpo de acuerdo con la invención, la depuración periférica y el catabolismo es por consiguiente favorecido en vez de la deposición dentro del tejido y/o fluidos corporales, particularmente el cerebro. El efecto benéfico del anticuerpo de acuerdo con la invención puede obtenerse por lo tanto sin la unión del anticuerpo a la placa.

Mediante esta actividad estabilizante, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede neutralizar los efectos tóxicos de la proteína amiloide polimérica y soluble menos agregada, particularmente la proteína amiloide β (Aβ), en el tejido y/o fluidos corporales. En una realización específica de la invención el anticuerpo de acuerdo con la invención puede por consiguiente lograr sus efectos benéficos sin unirse necesariamente a la amiloide beta agregado en el cerebro.

En un aspecto adicional de la invención, se provee un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la presente invención y como se describe aquí anteriormente, comprende por lo menos una cadena liviana o un

fragmento de la misma, o por lo menos una cadena pesada o un fragmento de la misma incorporando por lo menos uno, particularmente dos y más particularmente tres regiones CDR obtenidas de un anticuerpo donor de ratón, particularmente a partir del anticuerpo de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a través de la aplicación) depositado en Diciembre 01 de 2005 con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo acceso no. DSM ACC2750, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo tiene una afinidad con el antígeno Aβ donde por lo menos 5 veces, particularmente por lo menos 8 veces, más particularmente por lo menos 10 veces, pero especialmente por lo menos 15 veces mayor que aquel del anticuerpo donor de ratón.

El anticuerpo de esta invención puede ser, en una realización, un anticuerpo completo (e.g. con dos cadenas livianas de longitud completa y dos cadenas pesadas de de longitud completa) de cualquier isótopo y subtipo (e.g. IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 e IgA2); pero especialmente un anticuerpo del isótopo IgG4; alternativamente, en otra realización, puede ser un fragmento de unión al antígeno (e.g. Fab y $F(ab')_2$, y Fv) de un anticuerpo completo.

La invención por consiguiente se relaciona con fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos descritos aquí. En una realización de la invención, el fragmento se selecciona del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento Fab’, un fragmento $F(ab')_2$, y un fragmento F_V, incluyendo los productos de una librería de expresión de inmunoglobulinas y fragmentos de unión a epítopes de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención se conjuga con polietilenglicol. Incluso en otra realización, la región constante del anticuerpo de la invención se modifica para reducir por lo menos una función efectora biológica mediada por una región constante relativa a un anticuerpo no modificado. Incluso en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.

La invención se relaciona adicionalmente con una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo quimérico o

un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se reveló aquí anteriormente.

En particular, la invención se relaciona con una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un grupo de moléculas de aminoácido contiguas como se da en la SEC ID No.: 2 y 3, respectivamente, o la secuencia complementaria, que representa las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) 2 y 3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Más particularmente, la invención se relaciona con una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un grupo de moléculas de aminoácido contiguas como se da en la SEC ID No.: 4, o la secuencia complementaria, que representa las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) 1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da en la SEC ID No.: 18 y SEC ID No.: 19, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de aminoácidos de CDR2 y CDR3, respectivamente, de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da en la SEC ID No.: 20, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de nucleótidos de CDR1 de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR).

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da en la SEC ID No.: 21, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de cadena liviana.

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos como se da en la SEC ID No.: 22, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de cadena liviana completa incluyendo las secuencias señal.

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena liviana de SEC ID No.: 22 y la región constante de cadena liviana de SEC ID No.: 23. La invención también comprende la hebra complementaria de dicha molécula de nucleótido.

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos SEC ID No.: 24 que codifica la región variable de cadena pesada. La invención también comprende la hebra complementaria de dicha molécula de nucleótido.

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC ID No.: 25 que codifica la región variable de cadena pesada completa incluyendo las secuencias señal. La invención también comprende la hebra complementaria de dicha molécula de nucleótido.

En otra realización de la invención se provee una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de SEC ID No.: 25 y la región constante de cadena pesada de SEC ID No.: 26. La invención también comprende la hebra complementaria de dicha molécula de nucleótido.

La presente invención también comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a una de las secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos como se describió anteriormente, de la invención, particularmente a la hebra complementaria de la misma, ya sea aislada o como parte de una molécula de nucleótido más grande.

En particular, la invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo las condiciones de hibridación convencionales, particularmente bajo condiciones estringentes de hibridación, a cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas en las SEC ID No.: 18-26 y 29- 32, particularmente a la hebra complementaria de la misma.

En otra realización de la invención se provee un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucléico de acuerdo con la invención y como se menciona aquí anteriormente.

En otra realización de la invención se provee una célula que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucléico de acuerdo con la invención y como se menciona aquí anteriormente.

Incluso en otra realización, la invención se relaciona con una composición que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describe aquí antes de incluir cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente efectiva, en particular una composición que es una composición farmacéutica que comprende opcionalmente adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la invención, dicha composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente efectiva.

La invención comprende adicionalmente una mezcla que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describe aquí anteriormente incluyendo cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente efectiva y, opcionalmente, además una sustancia activa biológicamente y/o un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En particular, la invención se relaciona con una mezcla, en donde la sustancia biológicamente activa es un compuesto usado en la medicación de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o de tipo amiloide tal como la proteína Aβ involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la invención, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo también puede ser un agente terapéutico que se puede usar en el

tratamiento de amiloidosis causada por amiloide-β se puede usar en la medicación de otros trastornos neurológicos.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico mediante un mecanismo igual o similar al del anticuerpo de acuerdo con la invención o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión neutrónica, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolina esterasa, bloqueadores de los canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes benzodiazepinas, potenciadores de la síntesis, conservación o liberación de acetilcolina, agonistas del receptor post-sináptico de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroides, antioxidantes y antagonistas del receptor serotonérgico.

Más particularmente, la invención se relaciona con una mezcla que comprende por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos efectivos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS), activadores de α-secretasa, β- y γ–inhibidores de secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes anti-hoja β, atractores para la depuración de amiloide-β/ agotar componentes celulares, inhibidores de amiloide beta truncada en el extremo N-terminal incluyendo amiloide beta 3-42, moléculas antiinflamatorias o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina, agonistas de M1 y otros fármacos incluyendo cualquier fármaco modificador de amiloide o tau y suplementos nutritivos, y suplementos nutritivos junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se relaciona adicionalmente con una mezcla, en donde el compuesto es un inhibidor de colinesterasa (ChEI), particularmente una mezcla, en donde el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina, niacina y memantina.

En una realización adicional, las mezclas de acuerdo con la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización aún de la invención se proporcionan las mezclas que comprenden “antipsicóticos atípicos” tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de los síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestado por incoherencia marcada, descarrilamiento, tangencialidad), y conducta extraña o desorganizada, además de anhedonia, bloqueo afectivo, apatía y aislamiento social junto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la invención y como se describe aquí y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Otros compuestos que se pueden usar en forma adecuada en mezclas en combinación con el anticuerpo de acuerdo con la presente invención están descritos en WO 2004/058258 (ver especialmente las páginas 16 y 17) que incluyen objetivos de fármacos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcanosulfónico y ácidos alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroides (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por los proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores de colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metal (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de las sustancias

biológicamente activas del cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), tales documentos están incorporados aquí como referencias.

En otra realización, la invención se relaciona con una mezcla que comprende el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención, y como se describe aquí anteriormente y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente efectiva.

La invención se relaciona adicionalmente con el uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de inicio adulto; amiloidois cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular.

La presente invención también comprende un método para la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica o una mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva, para uso en un método para prevenir, tratar o aliviar

los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD) demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo adulto; amiloidois cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular que comprende la formulación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende adicionalmente un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo adulto; amiloidois cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular, por la administración de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, pero particularmente un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, a un animal o a un ser humano afectado por dicho trastorno que comprende la administración del anticuerpo en una cantidad terapéuticamente efectiva.

También es un objeto de la invención proveer un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) particularmente un trastorno o condición caracterizado por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva mediante administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención y como se describe aquí.

En una realización específica la invención provee un método para retener o incrementar la capacidad de memoria cognitiva de un animal, pero, particularmente, para restaurar la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que sufre de deterioro de la memoria mediante administración a un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención y como se describe aquí anteriormente.

Es un objeto adicional de la invención proveer una composición terapéutica y un método para producir dicha composición así como un método para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD) particularmente un trastorno o condición caracterizado por la pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, utilizando un anticuerpo de acuerdo con la invención como se describe aquí anteriormente.

En particular, la invención se relaciona con el tratamiento de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece una afección asociada con amiloide caracterizada por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva que lleva a la retención de la capacidad de memoria cognitiva.

La invención se relaciona adicionalmente con un método de diagnóstico de una enfermedad o condición asociada a amiloide en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del

mismo a un epítope de la proteína amiloide en una muestra o *in situ,* que incluye los pasos de

(a) poner la muestra o parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha contiene la proteína amiloide en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente, y/o una parte funcional del mismo, anticuerpo que se une a un epítope de la proteína amiloide;

(b) permitir que el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo se una al antígeno amiloide para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno amiloide en la muestra o parte o área específica del cuerpo.

También comprende un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas que comprende en un tejido y/o fluidos corporales

(a) obtener una muestra representativa del tejido y/o fluidos corporales bajo investigación;

(b) examinar dicha muestra para determinar la presencia del antígeno amiloide con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente, y/o una parte funcional del mismo,

(c) determinar la cantidad de anticuerpo unido al antígeno; y

(d) calcular la carga total de placas del tejido y/o fluidos corporales.

En particular, la invención se relaciona con un método para determinar el grado de carga de placas amiloidogénicas en un tejido y/o fluidos corporales, en donde la formación del complejo inmunológico en el paso c) se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otra realización de la invención, se provee un kit de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo

con la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente, y/o una parte funcional del mismo.

En particular, la invención se relaciona con un kit de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con amiloide que comprende un recipiente que contiene uno o más anticuerpos de acuerdo con la presente invención, y/o una parte funcional de los mismos, e instrucciones para utilizar los anticuerpos con el propósito de unirse al la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo que comprende una región variable como se enuncia en la SEC ID No.: 27, o una variante del mismo. En una realización, una línea celular expresando el anticuerpo.

En otro aspecto, la invención provee un gen de un anticuerpo que comprende una región variable como se enuncia en la SEC ID No.: 29, o una variante del mismo. En una realización, una línea celular expresando el anticuerpo.

En otro aspecto, la invención provee un método para desagregar las fibras beta-amiloides preformadas, que comprende la interacción de un anticuerpo hC2 con fibras amiloide-beta preformadas.

En otro aspecto, la invención provee un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo protege a las neuronas de la degradación inducida por Abeta.

En otro aspecto, la invención provee un método para prevenir la degradación neuronal inducida por Abeta que comprende tratar las neuronas con una cantidad efectiva de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo de acuerdo con la revelación aquí.

En otro aspecto, la invención provee el uso de un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, de acuerdo con la descripción aquí para la preparación de un medicamento para prevenir la degeneración neuronal por exposición al oligómero Abeta.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita y las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE FIGURAS Y SECUENCIAS

Figura 1 (Ejemplo 2): Cassette de Expresión de la región variable de cadena liviana de ratón del Anticuerpo Quimérico.

Figura 2 (Ejemplo 2): Cassette de Expresión de la región variable de cadena pesada de ratón del Anticuerpo Quimérico.

Figura 3 (Ejemplo 5.2): Comparación de la región variable de cadena pesada de ratón a la secuencia lineal germinal murina más cercana

Figura 4 (Ejemplo 8): Actividad de anticuerpos humanizados C2 purificados

Figura 5 (Ejemplo 9): Actividad de unión de los anticuerpos producidos mediante la expresión transiente de construcciones de CDRL2 modificadas de C2 en conjunto con la cadena quimérica pesada C2, comparada con el anticuerpo quimérico C2ChVHAF/ChVK, producido mediante transfección transiente y el anticuerpo purificado.

Figura 6 (Ejemplo 11): Resultados del Ensayo de Unión Inmunohistoquímica con anticuerpo quimérico AF y anticuerpo humanizado H4K1.

Figura 7 (Ejemplo 12): Funcionalidad de mC2 sobre las fibras amiloides.

Figura 8 (Ejemplo 12): Afinidad de Unión de C2 humanizado en ELISA.

Figura 9 (Ejemplo 14): Conformación de unión específica de mC2 a diferentes clases de proteína amiloide. La preparación de sedimento en la leyenda de esta figura se refiere a fibras $A\beta_{1-42}$, la preparación del sobrenadante se refiere a monómeros amiloides.

Figura 10: Secuencias VK de C2 humanizado comparadas con secuencias murinas y secuencias del aceptor humano DPK15 y J_K1.

Figura 11: Secuencias VH de C2 humanizado comparadas con secuencias murinas y secuencias del aceptor humano DP54 AND J_H6.

Figura 12: ADN completo y secuencia de proteínas de la región variable de cadena liviana del anticuerpo C2 humanizado, C2HuVK1

Figura 13: ADN completo y secuencia de proteínas de la región constante de cadena liviana (C kappa humana) del anticuerpo C2 humanizado.

Figura 14: ADN completo y secuencia de proteínas de la región constante de cadena pesada (IgG4-ser228-pro humana) del anticuerpo C2 humanizado.

Figura 15A-C (Ejemplo 15): Resultados de los Experimentos del Mapeo de Epítopes

Figura 16 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayos de agregación

Figura 17 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayos de desagregación

Figura 18 (Ejemplo 16); Resultados de los experimentos de neuroagregación con anticuerpo humanizado C2.

SEC ID No.: 1: Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada C2 HuVH AF 4 humanizado (CDR1)

SEC ID No.: 2 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada C2 HuVH AF 4 humanizado (CDR2)

SEC ID No.: 3 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada C2 HuVH AF 4 humanizado (CDR3)

SEC ID No.: 4 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana C2 HuVK 1 humanizado (CDR1)

SEC ID No.: 5 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana C2 HuVK 1 humanizado (CDR2)

SEC ID No.: 6 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana C2 HuVK 1 humanizado (CDR3)

SEC ID No.: 7 Secuencia de aminoácidos de región del epítope 2 Aβ

SEC ID No.: 8 Secuencia de aminoácidos de región del epítope 1 Aβ

SEC ID No.: 9 Secuencia de aminoácidos de región del epítope 2 Aβ modificado

SEC ID No.: 10 Secuencia de aminoácidos de región del epítope 1 Aβ modificado

SEC ID No.: 11 Secuencia de aminoácidos de región del epítope modificada completa

SEC ID No.: 12 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana C2 HuVK 1 humanizado

SEC ID No.: 13 Secuencia de aminoácidos de cadena liviana de C2 humanizado

SEC ID No.: 14 Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena liviana de C2 humanizado

SEC ID No.: 15 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de C2 HuVH AF 4 humanizado

SEC ID No.: 16 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de C2 humanizado

SEC ID No.: 17 Secuencia de aminoácidos de la región C de la cadena de IG GAMMA-4 modificada

SEC ID No.: 18 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada CDR2 de C2 HuVH AF 4 humanizado

SEC ID No.: 19 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada CDR3 de C2 HuVH AF 4 humanizado

SEC ID No.: 20 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena liviana CDR1 de C2 HuVK 1 humanizado

SEC ID No.: 21 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena liviana de C2 HuVK 1 humanizado

SEC ID No.: 22 Secuencia de nucleótidos de cadena liviana de C2 humanizado

SEC ID No.: 23 Secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena liviana de C2 humanizado

SEC ID No.: 24 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada de C2 HuVH AF 4 humanizado

SEC ID No.: 25 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de C2 humanizado

SEC ID No.: 26 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada de C2 humanizado

SEC ID No.: 27: Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de Cadena Liviana de C2 de ratón

SEC ID No.: 28: Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de Cadena Pesada de C2 de ratón

SEC ID No.: 29: Secuencia de nucleótidos de cadena liviana de C2 ratón

SEC ID No.: 30: Secuencia de nucleótidos de cadena liviana de C2 de ratón

SEC ID No.: 31 : Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de Cadena Pesada de C2 de ratón

SEC ID No.: 32: Secuencia de nucleótidos de Cadena Pesada de C2 de ratón

DEFINICIONES

Los términos “polipéptido”, “péptido”, y “proteína”, como se usan aquí, son intercambiables y se definen como una biomolécula compuesta de aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Los términos "un", "una" y "el" como se usan aquí, se definen como "uno o más " e incluyen el plural a menos que el contexto fuera inapropiado.

El Lenguaje “enfermedades y desórdenes que son causadas por o están asociadas con proteínas amiloides o de tipo amiloide” incluye, pero no está limitada a, enfermedades y trastornos causados por la presencia o actividad de proteínas de tipo amiloide monomérico, de fibrillas o estado polimérico, o cualquier combinación de las tres. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no están limitados a, amiloidosis, tumores endocrinos, y degeneración macular.

El término “amiloidosis” se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placas amiloides, incluyendo, pero no está limitado a, amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad enfermedades tales como , incluyendo, pero no están limitadas a , trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD), incluyendo las enfermedades o condiciones caracterizadas por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, el deterioro cognitivo leve (MCI), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; Otras enfermedades que se basan o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), miositis con cuerpos de inclusión (IBM), diabetes de comienzo adulto y amiloidosis cardíaca senil, y varias enfermedades oculares que incluyen degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusen, y deposición de amiloide-beta debida a cataratas.

Los términos "detección" o "detectado" como se usan aquí significan el uso de técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tal como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a la determinación en forma cualitativa o cuantitativa de la presencia o concentración de la biomolécula en investigación.

“Amiloide polimérico soluble” se refiere a monómeros agregados múltiples de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo amiloide, o de péptidos amiloides truncados o modificados o de otros derivados de los péptidos amiloides, que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son solubles en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro, pero particularmente monómeros agregados múltiples de amiloide β (Aβ) o de péptidos de amiloide β modificados o truncados (Aβ) o de derivados de los mismos, los cuales son solubles en el cuerpo de mamíferos o seres humanos, más particularmente en el cerebro.

“β amiloide, Aβ o amiloide- β” es un término reconocido en el arte y se refiere a las proteínas y péptidos amiloides β, a la proteína precursora de la β amiloide (APP), además de las modificaciones, fragmentos y cualquiera de los equivalentes funcionales de los mismos. En particular, por β amiloide, como se

usa aquí, se entiende cualquier fragmento producido por la escisión proteolítica de APP, pero especialmente los fragmentos que están involucrados o asociados con las patologías amiloideas, que incluyen, pero no se limitan a, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$ $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y secuencias de los péptidos β amiloides como se mencionó anteriormente son bien conocidas por los expertos en el arte y los métodos para producir dichos péptidos o extraerlos del cerebro y otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm129, 885-890 (1984). Además, los péptidos β amiloides están disponibles comercialmente en varias formas.

Por “aislada” se entiende una molécula biológica libre de por lo menos alguno de los componentes con los cuales se produce de forma natural.

Los términos "anticuerpo” o “anticuerpos" como se usan aquí son términos reconocidos en el arte y se entiende que se refieren a las moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulinas y a porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une específicamente a un antígeno. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por las regiones génicas constantes de las inmunoglobulinas kappa y lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como miles de regiones genéticas variables de inmunoglobulinas. Las cadenas livianas se clasifican ya sea como kappa o lambda. Las cadenas pesadas están clasificadas como gamma, mu, alfa, delta o épsilon lo que a su vez define las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. También se sabe de subclases de cadenas pesadas. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgG en los seres humanos pueden ser de cualquier subclase IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. La inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA y IgY) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa aquí “se une específicamente” en referencia a un anticuerpo, significa que el anticuerpo se une a su antígenos objetivo con mayor afinidad con la que lo hace a antígeno (s) estructuralmente diferentes.

Se sabe que una unidad estructural típica de inmunoglobulina incluye un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par con una cadena “liviana” (aproximadamente de 25 kD) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena variable liviana (V_L) y cadena variable pesada (V_H) se refieren a estas cadenas livianas y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos en toda su longitud o como una serie de fragmentos bien caracterizada producida por la digestión con varias peptidasas o productos químicos. Por consiguiente, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo bajo los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F $(ab')_2$, un dímero de Fab el cual en sí mismo es una cadena liviana unida a V_H-CH1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir bajo condiciones moderadas para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo así el dímero $F(ab')_2$ en un monómero. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W, E, Paul, ed., Raven Press, NY (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Mientras que varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona versada en la materia notará que cualquiera de una variedad de fragmentos de anticuerpos se puede sintetizar de novo, ya sea químicamente o mediante la utilización de la metodología de ADN recombinante. Por consiguiente, el término anticuerpo, como se usa aquí también incluye fragmentos de anticuerpos, ya sea producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo o anticuerpos y fragmentos obtenidos mediante el uso de metodologías de ADN recombinante.

Se entiende que “anticuerpos” dentro del alcance de la presente invención que incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena única, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados además de los fragmentos activos del mismo. Los ejemplos de fragmentos activos de las moléculas que se unen a antígenos conocidos incluye cadenas liviana y pesada separadas y los fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab’ y $F(ab')_2$ que incluyen los productos de una genoteca de expresión de inmunoglobulina Fab y los fragmentos de unión con el epítope de cualquiera de los anticuerpos y los fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos se pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención por varias técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden escindir con una enzima, tal como pepsina, y someter a HPLC de filtración en gel. La fracción apropiada que contiene los fragmentos Fab luego se puede recoger y concentrar por filtración de membrana y similares. Para la descripción adicional de las técnicas generales para aislamiento de los fragmentos activos de los anticuerpos, ver por ejemplo, Khaw, B. A. y cols. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux y cols. Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Los anticuerpos hechos de forma recombinante pueden ser anticuerpos de longitud completa convencionales, fragmentos activos de anticuerpos conocidos por digestión proteolítica, fragmentos activos de anticuerpos únicos tales como Fv o Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos eliminados del dominio, y similares. Un anticuerpo Fv tiene aproximadamente 50kD en tamaño y comprende las regiones variables de la cadena liviana y pesada. Un polipéptido de Fv de cadena sencilla (“scFv”) es un heterodímero VH::VL enlazado de forma covalente que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye las secuencias que codifican VH- y VL ya sea unidos directamente o unido mediante un agente enlazante que codifica para péptidos. Ver Huston, y cols. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Una variedad de estructuras para convertir las cadenas polipeptídicas livianas y pesadas agregadas naturalmente, pero químicamente separadas de una región de anticuerpos V en una molécula scFv que se convertirá en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Ver e.g. Patentes de EU Nos. 5,091,513, 5,132,405 y 4,956,778.

El sitio de combinación se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión del antígeno. El sitio de unión del antígeno está formado por residuos de aminoácido de las regiones variables (“V”) del extremo N-terminal de las cadenas pesada (“H”) y liviana (“L”). Las regiones variables de anticuerpos comprenden tres regiones divergentes referidas como “regiones hipervariables” o “regiones determinantes de complementariedad” (CDRs) que están ubicadas de forma alternada entre espacios circundantes más conservados conocidos como “regiones marco” (FR). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) se

disponen una en relación a la otra en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno o bolsillo. El sitio de combinación del anticuerpo representa por lo tanto los aminoácidos que conforman los CDRs de un anticuerpo y cualquier residuo marco que conforma el bolsillo en el sitio de unión.

La identidad de los residuos de aminoácido en un anticuerpo particular que conforma el sitio de combinación se puede determinar utilizando métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, las CDR de anticuerpos se pueden identificar mientras que las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat y cols. (ver “Sequence of Proteins of Immunological Interest” E. Kabat y cols U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G. y Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions, nucleic Acids Research, 29: 205-206; http://immuno.bme.nwa.edu). Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como estructuras del bucle estructural, originalmente descritas por Chothia y otros (Ver Chothia y Lesk, J. MoI. Biol. 196, 901 (1987), Chothia y cols., Nature 342, 877 (1989), y Tramontano y cols., J. MoI. Biol. 215, 175 (1990)). Otros métodos incluyen la “Definición AbM” que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva utilizando el programa de modelamiento de anticuerpos Oxford Molecular's AbM (ahora Accelrys) o la “definición de contacto” de CDR por Macallum y cols., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography," J MoI Biol. 1996 Oct 11;262(5):732-45). La siguiente tabla identifica CDR con base en varias definiciones conocidas.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24- L34	L24- L34	L24- L34	L30- L36
L2	L50- L56	L50- L56	L50- L56	L46-L55
L3	L89- L97	L89- L97	L89- L97	L89-L96
H1	H31 – H35B	H26—H35B	H26—H32.34	H30 –H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31 – H35	H26—H35	H26—H32	H30 –H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50- H65	H50 -- H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95- H102	H93- H101

Las indicaciones generales mediante las cuales se pueden identificar CDR en un anticuerpo a partir únicamente de la secuencia son las siguientes:

LCDR1:

Inicio - Aproximadamente residuo 24.

El residuo anterior siempre es una Cys.

El residuo siguiente siempre es un Trp. Típicamente TRP es seguido de TYR-GLN, pero también puede ser seguido de LEU-GLN, PHE-GLN, o TYR-LEU.

La longitud es 10 a17 residuos.

LCDR2:

Inicio - 16 residuos después del final de L1.

La secuencia anterior es generalmente ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS, o ILE-PHE.

La longitud es generalmente 7 residuos.

LCDR3:

Inicio - generalmente 33 residuos después del final de L2.

El residuo anterior es una Cys

La secuencia siguiente es PHE-GLY-X-GLY.

La longitud es 7 a 11 residuos.

HCDR :

Inicio – En aproximadamente el residuo 26 (cuatro residuos después de una CYS) [Chothia / definición AbM] definición Kabat inicia 5 residuos después.

La secuencia anterior es CYS-X-X-X.

Los residuos después son un TRP, típicamente seguido por VAL, pero también seguido por ILE, o ALA.

La longitud es 10 a 12 residuos según la definición AbM mientras que la definición de Chothia excluye los últimos 4 residuos.

HCDR2:

Inicio - 15 residuos después del final de la definición de Kabat /AbM de CDR-H 1.

La secuencia anterior es típicamente LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEC ID No.. 1), pero es posible un grupo de variaciones.

La secuencia siguiente es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

La longitud es 16 a 19 residuos según la definición de Kabat (la definición AbM termina 7 residuos antes).

HCDR3:

Inicio -33 residuos después del final de CDR-H2 (dos residuos después de una CYS).

La secuencia anterior es CYS-X-X (Típicamente CYS-ALA-ARG).

La secuencia siguiente es TRP-GLY-X-GLY.

La longitud es 3 a 25 residuos.

La identidad de los residuos de aminoácido en un anticuerpo particular que están fuera de las CDR, pero que de todas maneras hacen parte del sitio de combinación teniendo una cadena lateral que es parte de la alineación del sitio de combinación (es decir, está disponible para el enlace a través del sitio de combinación), se puede determinar usando métodos bien conocidos en el arte tales como modelamiento molecular y cristalografía de rayos X. Ver e.g., Riechmann y cols., (1988) Nature, 332:;323-327.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que una o más regiones del anticuerpo son de una especie animal y una o más regiones del anticuerpo forman diferentes especies de animales. Un anticuerpo quimérico preferido es uno que incluye regiones de una inmunoglobulina de primate. Se entiende típicamente un anticuerpo quimérico para uso clínico humano tiene regiones variables de un animal no humano, por ejemplo, e.g. un roedor, con las regiones constantes de un humano. En contraste, un anticuerpo humanizado usa CDR del anticuerpo no humano con la mayoría o todas las variables regiones marco y todas las regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo quimérico humano tiene regiones constantes de cadena pesada humanas y regiones constantes de cadena liviana humanas con regiones variables tanto de la pesada y liviana que

vienen de un anticuerpo de roedor. Un anticuerpo quimérico puede incluir algunos cambios a una secuencia nativa de aminoácidos de regiones constantes humanas y la secuencia nativa de región variable de roedor. Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden preparar por métodos bien conocidos en el arte incluyendo aproximaciones a injertos de CDR (ver, e.g., Patentes de EU Nos. 5,843,708; 6,180,370; 5,693,762; 5,585,089; 5,530,101), estrategias de intercambio de cadena (ver e.g., Patente de EU No. 5,565,332; Rader y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:8910-8915), estrategias de modelamiento molecular (Patente de EU No. 5,639,641), y similares.

Un "anticuerpo humanizado" como se usa aquí en el caso de un anticuerpo de dos cadenas es uno donde por lo menos una cadena está humanizada. Una cadena de un anticuerpo humanizado tiene una región variable en donde una o más regiones marco son humanas. Un anticuerpo humanizado que es una cadena sencilla es uno donde la cadena tiene una región variable donde uno o más de las regiones marco son humanas. Las porciones no humanas de la región variable de la cadena del anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se derivan de una fuente no humana, particularmente un anticuerpo no humano, típicamente de origen roedor. La contribución no humana al anticuerpo humanizado se provee típicamente en forma de al menos una región de CDR que está localizada de forma alternada entre las regiones marco derivadas de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los residuos del soporte de la estructura se pueden alterar para conservar la afinidad de unión.

El anticuerpo humanizado puede comprender adicionalmente regiones constantes (e.g. por lo menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena liviana, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). Las regiones constantes de un anticuerpo humanizado, si están presentes, generalmente son humanas.

Los métodos para obtener “anticuerpos humanizados” son bien conocidos por los expertos en el arte. (ver, por ej., Queen y cols., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson y cols., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" también se puede obtener mediante un nuevo método de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos

policlonales similares a los humanos de afinidad madura en animales grandes tales como, por ejemplo, conejos y ratones. (Ver, e.g. Pat de E.U. No. 6,632,976).

El término región constante (CR) como se usa aquí, se refiere a los genes de regiones constantes de la inmunoglobulina. Los genes de la región constante codifican la porción de la molécula del anticuerpo que confiere funciones efectoras. Para anticuerpos quiméricos humanos y anticuerpos humanizados, las regiones constantes típicamente no humanas (e.g. murina) se sustituyen con regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados objeto se derivan típicamente de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isótopos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Adicionalmente, las cadenas pesadas de varias subclases (tales como las subclases IgG de las cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras y por consiguiente, por elección de la región constante de cadena pesada, se pueden producir los anticuerpos con la función efectora deseada. Las regiones constantes que se pueden utilizar dentro del alcance de esta invención son gamma 1 (IgG1), particularmente una región Fc del isótopo gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) y especialmente gamma 4 (IgG4). La región constante de cadena liviana puede ser del tipo kappa o lambda, preferiblemente del tipo kappa. En una realización la región constante de cadena liviana es la cadena constante kappa humana (Heiter y cols. (1980) Cell 22:197-207) y la cadena constante pesada es la cadena constante IgG4 humana.

El término “anticuerpo monoclonal” también es bien conocido en el arte y se refiere a un anticuerpo que es producto de una célula que produce anticuerpos clonados. Los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente por fusión de una célula B productora de anticuerpos, normalmente de vida corta, a una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (algunas veces denominada célula “inmortal”). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, crea un clon que produce el anticuerpo.

Para el propósito de la presente invención, se entiende también que “anticuerpo monoclonal” comprende a los anticuerpos producidos por un clon madre que no ha alcanzado la monoclonalidad completa.

Se entiende dentro del alcance de la presente invención que “anticuerpo funcionalmente equivalente” se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente por lo menos una propiedad funcional principal con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito aquí que comprende: la especificidad de unión con la proteína amiloide- β, particularmente con la proteína $A\beta_{1-42}$ y más particularmente con la región epitópica 16-21 de la proteína $A\beta_{1-42}$, inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros de $A\beta_{1-42}$ en fibrillas poliméricas de alto peso molecular y/o desagregación de fibrillas poliméricas $A\beta_{1-42}$ preformadas y/o una propiedad anti-hoja β y alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas, trastornos neurológicos tal como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionado con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo adulto; amiloidois cardíaca senil, tumores endocrinos y otros que incluyen degeneración macular, cuando se administra en forma profiláctica o terapéutica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM, o IgA, etc o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc y otras subclases mencionadas anteriormente aquí o conocidas en el arte pero particularmente de la clase IgG4. Además, los anticuerpos se pueden producir por cualquier método tal como despliegue en fagos, o producido en cualquier organismo o línea celular, que incluye bacterias, insecto, mamífero u otro tipo de células o línea celular que produce anticuerpos con características deseadas, tal como los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también se pueden formar por la combinación de una porción Fab y una región Fc de diferentes especies.

El término “hibridizar” como se usa aquí, se refiere a las condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a las condiciones de hibridación en las que se usa SSPE 5x, SDS 1% , solución de Denhardt 1x como solución y/o temperaturas de hibridación entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Después de la hibridación, el lavado se realiza preferiblemente primero con SSC 2x, SDS 1% y posteriormente con SSC 0,2x a temperaturas entre 35°C y 70°C,

preferiblemente a 65°C (con respecto a la definición de SSPE, SSC y solución de Denhardts (ver Sambrook y cols. loc. cit.). Las condiciones de hibridación estringente como por ejemplo, las descritas en Sambrook y cols, supra, se prefieren particularmente. Las condiciones de hibridación estringente particularmente preferidas están presentes por ejemplo, si la hibridación y el lavado ocurren a 65°C como se indicó anteriormente. Las condiciones de hibridación no estringente, por ejemplo con hibridación y lavado llevado a cabo a 45°C son menos preferidas y a 35°C incluso menos.

La “homología” entre dos secuencias es determinada por identidad de secuencia. Si dos secuencias que se comparan entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia preferiblemente se refiere al porcentaje de los residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos con los residuos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas de computación tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). El Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, con el fin de hallar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene por ejemplo 95% de identidad con un secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros preferiblemente se ajustan de modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de referencia y que se permitan las brechas de homología de hasta 5% del número total de nucleótidos con la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en los valores preestablecidos ("predeterminados"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias anteriormente descriptas de la invención se pueden originar por ejemplo por adición, supresión, sustitución, inserción o recombinación. Tal comparación de secuencia se puede realizar preferiblemente también con el programa “fasta20u66” (versión 2.0u66, setiembre 1998 por William R. Pearson y la University of Virginia; ver también W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, ejemplos anexos y http://workbench.sdsc.edu/). Para este propósito se pueden usar los ajustes parámetros "predeterminados”.

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser una inmunoglobulina o anticuerpo, del que se entiende que tiene sus sitios de unión idénticos (si es multivalente) o, alternativamente, puede ser un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional”.

Un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/liviana. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab’. (Ver e.g., Songsivilai & Lachman, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y cols, J. Immunol. 148, 1547- 1553 (1992)).

El término “fragmento” se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpos que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpos completa o intacta. Los fragmentos también se pueden obtener vía tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpos completa o intacta. Los Fragmentos también se pueden obtener por medios recombinantes. Los fragmentos ejemplares incluyen fragmentos Fab, Fab’, $F(ab')_2$, Fabc y/o Fv. El término “fragmento de unión al antígeno” se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto a partir del cual se derivan) por la unión al antígeno (es decir, unión específica).

Los fragmentos de unión se producen mediante las técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab’, $F(ab')_2$, Fabc, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla.

“Fragmento” también se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 5 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 10 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 15 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 20 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 25 residuos contiguos de aminoácidos, de por lo menos 40 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 50 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 60 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 70 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 80 residuos contiguos de aminoácidos,

por lo menos 90 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 100 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 125 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 150 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 175 residuos contiguos de aminoácidos, por lo menos 200 residuos contiguos de aminoácidos o por lo menos 250 residuos contiguos de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido retiene por lo menos una función del polipéptido.

El término “antígeno” se refiere a una entidad o fragmento del mismo que se puede unir a un anticuerpo. Un inmunógeno se refiere a un antígeno que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero que incluye un ser humano. El término incluye regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítopes que se refieren a una porción del antígeno (que es puesto en contacto o que tiene un papel significativo para soportar un contacto reside en el antígeno responsable de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

Como se usa aquí, el término “soluble” significa parcialmente o completamente disuelto en una solución acuosa.

También como se usa aquí, el término "inmunogénico" se refiere a las sustancias que estimulan o aumentan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un antígeno del inmunógeno.

Una respuesta inmune se produce cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas contra composiciones inmunogénicas administradas en la presente invención para moderar o aliviar el trastorno tratado.

El término inmunogenicidad como se usa aquí se refiere a la medida de la habilidad de un antígeno para estimular una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un paciente. La presente invención se relaciona con aproximaciones que reducen la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos humanos o humanizados objeto.

Un anticuerpo humanizado de inmunogenicidad reducida se refiere a un anticuerpo humanizado que exhibe inmunogenicidad reducida en relación con el anticuerpo padre, e.g. el anticuerpo murino.

Un anticuerpo humanizado que retiene sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo padre se refiere a un anticuerpo humanizado que retiene la habilidad de unirse específicamente al antígeno reconocido por el anticuerpo padre utilizado para producir dicho anticuerpo humanizado. Preferiblemente el anticuerpo humanizado exhibirá la misma o sustancialmente la misma afinidad de unión al antígeno y avidez que el anticuerpo padre. Idealmente, la afinidad del anticuerpo no será menor del 10% de la afinidad del anticuerpo padre, más preferiblemente no menor del 30%, y más preferiblemente la afinidad no será menor del 50% del anticuerpo padre. Los métodos para realizar ensayos de afinidad de unión al antígeno son bien conocidos en el arte e incluyen los ensayos de unión máxima media, ensayos de competencia y análisis de Scatchard. Ensayos de unión a antígenos apropiados se describen en esta solicitud.

Una “mutación reversa” es una mutación introducida en una secuencia de nucleótidos la cual codifica un anticuerpo humanizado, la mutación resulta en un aminoácido que corresponde a un aminoácido en el anticuerpo padre (e.g., anticuerpo donor, por ejemplo, un anticuerpo murino). Ciertos residuos marco del anticuerpo padre se pueden retener durante la humanización de los anticuerpos de la invención con el fin de retener sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo padre, mientras que al mismo tiempo se minimiza la inmunogenicidad potencial del anticuerpo resultante. En una realización de la invención, el anticuerpo padre tiene origen de ratón. Por ejemplo, la mutación reversa cambia un residuo de un marco humano a un residuo murino padre. Ejemplos de residuos marco que se pueden mutar de forma reversa incluyen, pero no están limitados a, residuos canónicos, residuos de empaque en la interface, residuos padre inusuales que están cercanos al sitio de unión, residuos en la “Zona Vernier” (que forma una plataforma en la que descansan las CDR) (Foote & Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224, 487-499), y aquellos cercanos a CDR H3.

Como se usa aquí, un “cambio conservativo" se refiere a alteraciones que son sustancialmente neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa.

Cuando se refieren a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácidos que no presta el anticuerpo capaz de unirse al sujeto receptor. Aquellos versados en la materia estarán en condiciones para predecir las sustituciones de aminoácido que se pueden realizar mientras se mantiene una alta probabilidad de ser neutrales conformacionalmente o antigénicamente. Se provee dicha guía, por ejemplo en Berzofsky, (1985) Science 229:932-940 y Bowie y cols. (1990) Science 247:1306-1310. Los factores a considerar, que afectan la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no están limitados a: (a) es menos probable que la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos afecte la antigenicidad porque es más probable que los residuos estén localizados en el interior de una proteína, (b) es menos probable que la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares afecte la conformación porque el aminoácido sustituido imita estructuralmente al aminoácido nativo; y (c) es menos probable que la alteración de secuencias conservadas evolutivamente afecte adversamente la conformación mientras que dicha conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueda tener importancia. Una persona versada en la materia podrá evaluar alteraciones en la conformación de proteínas utilizando ensayos bien conocidos, tales como, pero no limitados a métodos de fijación de microcomplementos (Wasserman y cols. (1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine y cols. (1967) Meth. Enzymol. 11:928-936) y a través de estudios de unión que usan anticuerpos monoclonales que dependen de la conformación (Lewis y cols. (1983) Biochem. 22:948-954).

Adicionalmente, el término " cantidad efectiva terapéuticamente" se refiere a la cantidad de anticuerpo que, al administrarse a un ser humano o un animal, que es suficiente para resultar en un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad efectiva determinada fácilmente por una persona versada en la materia siguiendo procedimientos de rutina.

Como se usa aquí, los términos "tratar," "prevenir," "previniendo," y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o inicio de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto que resulta en la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Construcción de Anticuerpos Humanizados

La presente invención se puede entender más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones específicas, incluidas aquí. Si bien, la presente invención se ha descripto con referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones de las misma, no se pretende que tales detalles sean considerados como limitaciones al alcance de la invención.

La presente invención provee métodos novedosos y composiciones que comprenden anticuerpos altamente específicos y altamente efectivos que tienen la habilidad de reconocer y unirse específicamente a epítopes de un rango de antígenos β amiloides. Los anticuerpos permitidos mediante la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y amiloidosis relacionada con la edad tal como enfermedades que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (AD), demencia de cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandesa); complejo Parkinson-demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan o asocian con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo holandesa, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de comienzo adulto; amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos y otras que incluyen degeneración macular, sólo por nombrar algunas.

Se puede crear una región variable completamente humanizada o reformada de acuerdo con la presente invención dentro del alcance del invención diseñando primero una secuencia de aminoácidos de región variable que contiene CDR no humanas, particularmente derivadas de roedores, pero especialmente CDR derivadas de anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” a través de la solicitud y depositado en Diciembre 01 de 2005 con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las condiciones del Tratado de Budapest bajo acceso no. DSM ACC2750), incluido en las secuencias de marco derivadas de humano. Las CDR no humanas, particularmente derivadas de roedores, que se pueden obtener a partir del anticuerpo de acuerdo con la presente invención,

proveen la especificidad deseada. En concordancia, estos residuos se incluyen en el diseño de la región variable reformada que esencialmente no cambia. Cualquier modificación debe restringirse, por consiguiente, a un mínimo, y observada de forma minuciosa para notar cambios en la especificidad y afinidad del anticuerpo. Por otro lado, los residuos marco en teoría se pueden derivar de cualquier región variable humana.

Con el fin de crear un anticuerpo reformado que muestra una afinidad aceptable o incluso mejorada, se deben elegir las secuencias marco humano, que es igualmente apropiado para crear una región variable reformada y para retener la afinidad del anticuerpo.

Con el fin de lograr este propósito, se desarrolló la estrategia “que mejor se ajusta”. Como se conoce, las secuencias de marco sirven para mantener los CDR en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos marco pueden incluso participar a veces en la unión al antígeno, ésta estrategia es útil para minimizar cambios que pueden afectar negativamente la estructura tridimensional del anticuerpo mediante derivación de la secuencia de marco humano utilizada para reformar anticuerpos a partir de la región variable humana que es más homóloga o similar a la no-humana, particularmente la región variable derivada de roedor. Esto también maximizará la probabilidad de que la afinidad se retenga en el anticuerpo reformado.

En su nivel más simple, la estrategia “que mejor se ajusta” involucra comparar la región donora V de roedor con todas las secuencias de aminoácidos de la región V humana, y luego seleccionar la más homóloga para proveer las regiones de marco aceptor para los ejercicios de humanización. En realidad hay varios factores diversos que se deben considerar, y que pueden influenciar la selección final de las regiones de marco aceptor. Las predicciones de modelamiento molecular se pueden utilizar en este punto antes de cualquier trabajo experimental en un intento para maximizar la afinidad del anticuerpo reformado resultante. Esencialmente, la meta del modelamiento es predecir que residuos marco humanos clave (si los hay) más homólogos se deben dejar como en el roedor para obtener la mejor afinidad en el anticuerpo reformado.

En una realización de la invención, las CDR se pueden obtener a partir de anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente a partir de anticuerpo monoclonal

de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” a través de la solicitud) descrito en la solicitud también en espera EP 05 02 7092.5 presentado en 12.12.2005, la revelación de la cual se incorpora aquí por referencia.

La línea celular de hibridoma FP-12H3-C2, que producen el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (llamado “mC2” y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a través de la solicitud) se depositaron el 1 de diciembre de 2005 en la solicitud también en espera EP 05 02 7092.5, con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las condiciones del Tratado de Budapest bajo acceso no. DSM ACC2750.

El anticuerpo de ratón se puede cultivar contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide- β, particularmente del péptido β amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$, y $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con un fragmento hidrofóbico tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un fragmento hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde los fragmentos hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente, están unidos a cada uno de los extremos del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como dispositivo conector para acoplar los fragmentos hidrofóbico e hidrofílico al fragmento de péptido. Cuando se utiliza PEG como fragmento hidrofílico, el extremo de PEG libre se enlaza de forma covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto apropiado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

En particular, un anticuerpo de ratón se puede cultivar contra una construcción antigénica supramolecular que comprende un péptido antigénico que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide- *β*, particularmente del péptido *β* amiloide $A\beta_{1-16}$, modificado con un fragmento hidrofílico tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), fragmento hidrofílico que está unido a cada uno de los extremos del péptido antigénico a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como dispositivo conector para acoplar los fragmentos hidrofóbico e hidrofílico al

fragmento de péptido. Cuando se utiliza PEG como fragmento hidrofílico, el extremo de PEG libre se enlaza de forma covalente a fosfatidiletanolamina o cualquier otro compuesto apropiado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incluir la construcción antigénica en la bicapa de un liposoma.

En una realización de la invención, se provee un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo que comprende en la región variable al menos una CDR de origen no humano incluida en una o más regiones de marco derivadas de humano -o primate- y combinada con una región constante derivada de un anticuerpo de fuente humana o primate, cuyo anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente y al péptido monomérico amiloide- β.

Las CDR contienen los residuos que más probablemente se unen al antígeno y en el anticuerpo reformado. Las CDR se definen mediante la secuencia de acuerdo con Kabat y cols., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Las CDR se encuentran en clases canónicas (Chothia y cols, 1989 Nature, 342, 877-883) en donde los residuos clave determinan en gran medida la conformación estructural del bucle de la CDR. Estos residuos casi siempre están retenidos en el anticuerpo reformado.

En el proceso para preparar un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena liviana y pesada C2 (V_H y V_K) se comparan con las secuencias del anticuerpo del roedor V_H y V_K en las bases de datos de la NCBI y de Kabat.

El gen germinal de ratón que más se acerca a la C2 V_K es bbl, Locus MMU231201, (Schable y cols, 1999). Una comparación revela que dos aminoácidos difieren de esta secuencia germinal, ambos están localizados dentro de la CDRL1. Se pueden encontrar anticuerpos murinos maduros con secuencia similar, pero no idéntica. Varios tienen CDRL2 y CDRL3 idénticas, pero la CDRL1 de C2 parece ser única. La comparación con las secuencias de la línea germinal humana V_K muestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor correspondencia para C2 V_k (Cox y cols, 1994). Por consiguiente, C2 V_k se puede asignar al subgrupo de la secuencia Kabat MUV$_K$II.

Puede seleccionarse la DPK 15 junto con la región humana J HuJ_K1 para proveer las secuencias marco aceptoras para la V_K humanizada.

Se han definido los residuos en la interface entre las cadenas variables liviana y pesada (Chothia y cols, 1985 J. MoI. Biol, 186, 651-663). Están usualmente retenidas en el anticuerpo retenido. El Phe en la posición 87 de C2 Vκ de ratón es inusual en la interface, en donde es más común una Tyr en el subgrupo V_KII, indicando que este residuo marco puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La Tyr 87 está presente en la C2VK germinal humana y humanizada.

Las secuencias humanizadas de V_K, por consiguiente, se pueden diseñar de modo tal que la C2HuVKl consiste en CDR C2 V_K con marcos a partir de DPK 15 y Jκ1 humana. En una realización específica de la invención, los residuos murinos pueden ser sustituidos en la región de marco humano en las posiciones posiciones 45, y/o 87. En la región CDR2 que se puede obtener a partir del anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se pueden realizar las sustituciones de aminoácidos en las posiciones de Kabat 50 y/o 53. El residuo 45 puede estar involucrado para sustentar la conformación de las CDR. El residuo 87 está localizado en la interface de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para mantener la unión del anticuerpo.

El gen germinal de ratón que es la mejor correspondencia para C2 V_H AF es VH7183, Locus AF 120466, (Langdon y cols, 2000). La comparación con las secuencias germinales humanas lineales de V_H muestra que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor correspondencia para C2 V_H. La C2 V_H AF se puede asignar al subgrupo de Kabat MuV_HIIID. La secuencia DP54 junto con la región humana J HuJ_H6 se pueden seleccionar para proveer las secuencias marco aceptoras para la V_H humanizada.

La comparación muestra que hay nueve diferencias de aminoácidos entre las secuencias de C2 VH y la secuencia germinal humana aceptora DP54 y J_H6, en su mayoría localizada dentro de CDRH2. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con CDRH1 idéntica o similar (un residuo diferente) o con CDRH2 similar (un residuo diferente), pero ninguna con las tres CDR idénticas a C2 V_H AF. La CDRH3 del anticuerpo C2 es inusualmente pequeña, consiste sólo de tres residuos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDRH3 de esta longitud. El residuo 47 de C2 V_H es Leu en vez del más común

Trp, y el residuo 94 es Ser en vez de la normal Arg, indicando que éstos residuos marco pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo.

Se pueden diseñar varias secuencias de V_H humanizadas. C2HuVH1 consiste en C2 V_H AF CDRs con marcos desde DP54 y HuJ_H6. En una realización específica de la invención, los residuos murinos se pueden sustituir en la región marco humana residuos en las posiciones 47 o 94 o juntas. El residuo 47 en el marco 2 hace contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K. El residuo 94 puede estar involucrado en sustentar la conformación de las CDR. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión al anticuerpo.

Se pueden diseñar las diferentes regiones HCVR y LCVR, que comprenden las CDR no humanas que se pueden obtener del anticuerpo donor, por ejemplo, un anticuerpo murino, incluido en las regiones marco derivadas de humano -o primate-, nativas o modificadas. La modificación particularmente puede involucrar un intercambio de uno o más residuos de aminoácido dentro de la región marco con residuos no humanos, particularmente residuos murinos, más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos o con residuos que tengan propiedades similares a aquellos más comúnmente encontrados en esta posición en los subgrupos respectivos.

La modificación de las secuencias de la región marco sirve para mantener las CDR en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los residuos marco a veces pueden participar incluso en la unión al antígeno. En una realización de la invención se toman medidas para adaptar adicionalmente las secuencias marco humanas seleccionadas para hacerlas más similares a las secuencias marco de roedores para maximizar la probabilidad de que la afinidad quede retenida en el anticuerpo reformado.

En concordancia, se pueden sustituir los residuos murinos en la región marco humano. En particular, los residuos murinos se pueden sustituir en la región marco humana de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) en las posiciones 47 o 94 o ambas y en la región marco humana de la Región Variable de Cadena Liviana (LCVR) en las posiciones 45 y/o 87. En la región CDR2 que se obtiene a partir de un anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente el anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2, se pueden realizar las sustituciones de aminoácidos en las posiciones de Kabat 50 y/o 53.

Los residuos encontrados en las posiciones indicadas anteriormente en la región marco humana se pueden intercambiar por residuos murinos más comúnmente encontrados en esta posición en los respectivos subgrupos. En particular, el Trp en la posición de Kabat 47 en las regiones marco derivadas de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEC ID No.: 15 se pueden reemplazar con una Leu o con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y la sustitución del cual lleva a alteraciones que son neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Trp en la posición de Kabat 47 en la región marco derivado de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEC ID No.: 15 se puede reemplazar adicionalmente con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en norleucina, Ile, VaI, Met, Ala, y Phe, particularmente con Ile. Se pueden contemplar sustituciones conservativas alternativas que son neutrales conformacionalmente y antigénicamente.

La Arg en la posición de Kabat 94 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEC ID No.: 15 se puede reemplazar con Ser o con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y cuya sustitución lleva a alteraciones que son sustancialmente neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Arg en la posición de Kabat 94 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEC ID No.: 15 se puede reemplazar alternativamente con Thr.

En otra realización de la invención, los dos residuos se pueden reemplazar en el anticuerpo humanizado.

La GIn en la posición de Kabat 45 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con Lys o con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y cuya sustitución lleva a alteraciones que son sustancialmente conformacionalmente neutrales o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la

GIn en la posición de Kabat 45 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, GIn, y Asn, particularmente con Arg.

La Leu en la posición de Kabat 50 en la región marco derivada de humano o primate de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con Lys o con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y cuya sustitución lleva a alteraciones que son sustancialmente neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Leu en la posición de Kabat 50 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, GIn, and Asn, particularmente con Arg.

La Asn en la posición de Kabat 53 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con His and GIn o con un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares y cuya sustitución lleva a alteraciones que son sustancialmente neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Asn en la posición de Kabat 53 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en GIn, His, Lys y Arg.

La Tyr en la posición de Kabat 87 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12 se puede reemplazar con Phe o con un residuo de aminoácido residuo que tiene propiedades similares y cuya sustitución lleva a alteraciones que son sustancialmente neutrales conformacionalmente o antigénicamente, produciendo cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo cambios mínimos en los determinantes antigénicos. En particular, la Tyr en la posición de Kabat 87 en la región marco derivada de humano -o primate- de la Región Variable de Cadena Liviana como se muestra en la SEC ID No.: 12

se puede reemplazar con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente con Leu.

La región variable así obtenida que comprende al menos una CDR de origen no humano incluida en una o más regiones marco derivadas de humano -o primate- puede combinarse entonces con una región constante derivada de un anticuerpo humano o primate, particularmente con las regiones humanas constantes IgG4 o K respectivamente. La región constante IgG4 se puede modificar por ejemplo, cambiando Serina en la posición 228 en la región bisagra a Prolina (HuIgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el puente disulfuro intercatenario y previene la formación de medias moléculas que podría ocurrir en las preparaciones de IgG4 humana nativa. La región constante IgG4 se puede modificar adicionalmente mediante deleción de la Lys terminal en la posición 439 así como se muestra en la SEC ID No.: 16.

Las regiones variables modificadas se pueden construir mediante el método conocido en el arte tal como, por ejemplo, solapamiento de recombinación por PCR. Los cassettes de expresión para el anticuerpo quimérico, C2 ChV_H AF y C2 ChV_K, se pueden usar como plantillas para la mutagénesis de las regiones marco a las secuencias requeridas. Los conjuntos de pares de cebadores mutagénicos se sintetizan abarcando las regiones a alterar. Los cassettes de expresión de V_H y V_K humanizadas producidas se pueden clonar en vectores de clonación apropiados conocidos en el arte tales como, por ejemplo, pUC19. Después de que se confirma que la secuencia de ADN es correcta para cada V_H y $V_κ$, los genes de la región V de cadena pesada y liviana se pueden eliminar del vector de clonación como cassettes de expresión. Luego éstos se pueden transferir a vectores de expresión apropiados tales como pSv*gpt* y pSY*hyg* que incluyen las regiones constantes Ser-Pro o κ de IgG4 humana, respectivamente.

VECTORES DE EXPRESIÓN

El vector de expresión *p*SV*gpt* se basa en *p*SV_2*gpt* (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para selección en células bacteriales, el gen gpt para selección en células de mamífero, la región que mejora la inmunoglobulina murina de cadena pesada, la secuencia genómica que codifica el gen de región constante y las secuencias SV40 poli A. La región variable de cadena pesada para la expresión se inserta como un fragmento *Hin*dIII a *Bam*Hl.

El vector de expresión pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para selección en células bacteriales, el gen *hyg* para selección en células de mamífero, la región que mejora la inmunoglobulina murina de cadena pesada, la secuencia genómica que codifica la región constante kappa incluyendo el potenciador kappa y las secuencias SV40 poli A. La región variable de cadena pesada para la expresión se inserta como un fragmento *Hin*dIII a *Bam*HI.

Luego se confirma que la secuencia de ADN es correcta para V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Para la producción de anticuerpos, los vectores de expresión de las cadenas pesada y liviana humanizadas se pueden introducir en líneas celulares de producción conocidas en el arte como, por ejemplo, células NSO. La introducción de los vectores de expresión se puede lograr mediante la co-transfección vía electroporación o cualquier otra tecnología de transformación disponible en el arte. Las líneas celulares de producción de anticuerpos se pueden seleccionar y expandir y los anticuerpos humanizados purificados. Los anticuerpos purificados se pueden analizar mediante técnicas estándar como SDS-PAGE.

ANTICUERPOS CON AFINIDAD MEJORADA, ESPECIFICA, ESTABLE

La secuencia CDRL2 (“KVSNRFS”) de un anticuerpo de C2 de ratón, puede ser ligeramente modificado sin advertencia afectiva en la actividad de un anticuerpo. Las sustituciones conservativas pueden ser cambiadas por R o K en la posición 50 y S para N en la posición 53. Las dos secuencias CDRL2 alternativas son por lo tanto “RVSNRFS” y “KVSSRFS”, respectivamente. Estos se incorporan en secuencia de V_K murina con no otros cambios, como C2 VK-R y C2 VK-S, respectivamente.

La afinidad, especificidad y estabilidad de un anticuerpo de acuerdo con la invención descrita aquí anteriormente, por lo tanto puede ser modificada por cambios de perfil de glicosilacion o el patrón del resultado terapéutico realizado.

Para lograr este cambio en el patrón de glicosilacion, las células huésped pueden someterse a ingeniería de tal manera que sean capaces de expresar un rango preferido de actividad de glicosil transferasa modificadora de glicoproteína, que incremente oligosacáridos N-enlazados complejos que portan GIcNAc bisectante. Adicionalmente, pueden obtenerse glicoformas modificadas de las glicoproteinas, por ejemplo anticuerpos, que incluyen moléculas de anticuerpo

enteras, fragmentos de anticuerpo o proteínas fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tienen una citotoxicidad celular mediada por Fc.

Los métodos de obtención de anticuerpos, los cuales son modificados con un patrón de glicosilacion conocidos como cualificados en el arte y describe, por ejemplo, en EP1071700, US2005272128, Ferrara y cols (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036); Ferrata y cols (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861.

PREPARACIÓN FARMACÉUTICA Y ADMINISTRACIÓN

Los anticuerpos de acuerdo con la invención, pero particularmente un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, se pueden preparar en una formulación aceptable para uso fisiológico y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente aceptables para uso farmacéutico empleando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo con la invención y como se describió aquí anteriormente, que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal que incluye a cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, se combina con un vehículo, diluyente y/o excipiente aceptables para uso farmacéutico para formar un composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes para usos farmacéutico adecuados son bien conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas de amortiguador fosfato, agua, emulsiones tales como aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede obtener mediante la metodología estándar conocida por los expertos en el arte.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol en una dosis efectiva para uso farmacéutico adecuada. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas, y unidades de dosis implantables. Las píldoras se pueden administrar en forma oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar de manera tópica. Las unidades de dosis implantables se pueden administrar en forma local, por

ejemplo, en un sitio del tumor, o se pueden implantar para la liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, en forma subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para la inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial y las formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones inhalatorias para la administración en los pulmones.

Las composiciones se pueden administrar por vías estándares de administración. En general, la composición se puede administrar por vías tópica, oral, rectal, nasal, interdérmica, intraperitoneal, o vías parenterales (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida tal como polímeros biodegradables, los polímeros se implantan en la vecindad de donde se desea la administración, por ejemplo, en el sitio del tumor. El método incluye la administración de una dosis única, administración de dosis repetidas en intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida para un período de tiempo determinado.

Una matriz de liberación sostenida, como se usa aquí, es una matriz realizada de materiales, usualmente polímeros los cuales son degradables por hidrólisis enzimática o ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa sobre las enzimas y líquidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige en forma deseable por materiales biocompatibles tal como liposomas, poliláctidos (ácido poliláctico), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poliláctico co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitin, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucléicos, ácidos poliamino, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de cualquier poliláctido, poliglicólido o poliláctico co-glicólido (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Es bien sabido por los expertos en el arte pertinente que la dosis de la composición dependerá de diversos factores tal como, por ejemplo, la condición tratada, la composición particular usada y otros factores clínicos tal como peso, tamaño, sexo y condiciones de salud general del paciente, área de superficie

corporal, el compuesto o composición particular administrado, otros fármacos administrados en forma concurrente y la vía de administración.

La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo, particularmente por lo menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propansulfónico (3APS), 1,3-propandisulfonato (1,3PDS),activadores de α-secretasa, inhibidores de β- y γ–secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, agentes anti-hoja β, atractores para depuración de amiloide-β / agotar componentes celulares, inhibidores de amiloide beta truncada en el N terminal incluyendo amiloide beta 3-42 piroglutamada, moléculas antiinflamatorias o “antipsicóticos atípicos” tales como, por ejemplo clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina, agonistas de M1 y otros fármacos incluyendo cualquier fármaco modificador de tau o amiloide y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acietil-L-carnitina, idebenona, propentofilina o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades.

La materia proteinácea farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración deberá ser del rango entre 0,1 µg y 10 mg del anticuerpo de acuerdo con la invención, particularmente del rango 1,0 µg a 1,0 mg, y más particularmente en un rango entre 1,0 µg y 100 µg, siendo todos los números individuales incluidos en estos rangos también parte de la invención. Si la administración se produce mediante la infusión continua, una dosis más adecuada puede estar en el rango entre 0,01 µg y 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por hora siendo todos los números individuales incluidos en estos rangos también parte de la invención.

La administración generalmente será por vía parenteral, por ej., intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y

emulsiones, acuosas o no acuosas, estériles. Los solventes no acuosos incluyen, sin limitarse a, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los solventes acuosos se pueden elegir del grupo que consiste en agua, soluciones alcohol/acuosa, emulsiones o suspensiones que incluyen medio salino y amortiguado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen los que ayudan a reponer líquidos, nutrientes y electrolitos (tal como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. Los conservantes también pueden estar presentes tal como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender también vehículos proteináceos tales como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina particularmente de origen humano. Otros agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependiendo del uso a que está destinada.

Cuando el blanco de unión se encuentra en el cerebro, algunas realizaciones de la invención establecen que el anticuerpo o fragmento activo del mismo debe atravesar la barrera sangre-cerebro. Algunas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un incremento en la permeabilidad de la membrana sangre-cerebro, de tal manera que el anticuerpo o fragmento activo del mismo puede ser fácilmente introducido en el cerebro. Cuando la barrera sangre-cerebro permanece intacta, existen diversos enfoques en el arte conocido para transportar moléculas a través de ésta, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en receptor y canal.

Los métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la membrana sangre-cerebro incluyen, pero no se limitan a, sortear la barrera sangre-cerebro completamente, o crear aberturas en la barrera sangre-cerebro. Los métodos para sortear incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (ver, e.g., Papanastassiou y cols., Gene Therapy 9: 398 – 406 (2002)) e implantar un dispositivo de entrega en el cerebro (ver por ejemplo Gill y cols., Nature Med. 9: 589 – 595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonido (ver por ejemplo la Publicación de Patente US

2002/0038086), presión osmótica (e.g., mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización mediante, por ejemplo bradiquinina o permeabilizante A-7 (ver, e.g., Las Patentes US 5,112,596, US 5,268,164, US 5,506,206 y US 5,686,416) y transfección de las neuronas que se encuentran en la barrera sangre-cerebro con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento que se une a antígeno (ver e.g., la Publicación de Patente US 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera sangre-cerebro incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que están acoplados a los fragmentos de unión del anticuerpo que se une a los receptores en el endotelio vascular de la barrera sangre-cerebro (ver e.g., la Publicación de la Solicitud de Patente US 20020025313), y recubrir el anticuerpo o fragmento activo del mismo en partículas de lipoproteína de baja densidad (Ver e.g., la Publicación de la Solicitud de Patente US 20040204354) o apolipoproteína E (Ver e.g., la Publicación de la Solicitud de Patente US 20040131692).

Los métodos basados en receptor y canal para transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera sangre-cerebro incluyen, pero no se limitan a, usar bloqueadores de glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro (ver, e.g., la Publicación de las Solicitudes de Patente US 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activar los canales de potasio (ver, e.g., la Publicación de la Solicitud de Patente US 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (ver, e.g. la Publicación de la solicitud de Patente No. 2003/0073713); recubrir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (ver, e.g., la Publicación de la Solicitud de Patente US 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (ver.e.g., la Patente US 5,004,697)

DETECCIÓN / DIAGNÓSTICO

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades o condiciones asociadas con amiloide. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos comúnmente usados para la detección o cuantificación de sustancias en muestras biológicas o en una condición *in situ*.

El diagnóstico de una enfermedad o condición asociada con amiloide en un paciente se puede lograr detectando la unión inmunoespecífica de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento activo del mismo con un epitope de la proteína amiloide en una muestra o *in situ,* lo que incluye poner en contacto la muestra o parte corporal o área corporal específica que se sospecha contiene la proteína amiloide, con un anticuerpo que se une a un epitope de la proteína amiloide, lo que le permite al anticuerpo unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o área corporal específica.

Las muestras biológicas que se pueden usar para el diagnóstico de una enfermedad o condición asociada con amiloide, son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucus, líquido cefalorraquídeo, líquido linfático y similares o tejido o muestras de células obtenidas de un organismo tal como tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína amiloide en una muestra se pude usar cualquier inmunoensayo conocido por los expertos en el arte. (Ver Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1988 555-612) tal como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirecta que emplean reactivos secundarios para la detección, ELISA y ensayos de inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos se brinda, por ejemplo, en los documentos WO 96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein y cols. (1998) y WO96/29605.

Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo se puede administrar al organismo a ser diagnosticado, mediante métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de modo que se pueda producir una unión específica entre el anticuerpo de acuerdo con la invención con una región epitópica de la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar mediante una marca unida al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico dependen típicamente de antígenos marcados, anticuerpos o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos puede marcarse con compuestos generalmente

conocidos por los expertos en el arte que incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminescentes y cromogénicas que incluyen partículas coloreadas, tales como oro coloidal y microesferas de látex. De estos, se puede usar el marcado radiactivo para casi todos los tipos de ensayos y con las mayores variaciones. Las marcas conjugadas con enzima son particularmente útiles cuando se debe evitar la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, si bien requieren equipamiento costoso para uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos policlonales de afinidad purificados

De manera alternativa, se puede marcar el anticuerpo de forma indirecta mediante la reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad por la inmunoglobulina, tales como la proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo se puede conjugar con una segunda sustancia y se puede detectar con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y el conjugado anticuerpo-biotina se puede detectar usando avidina o estreptavidina marcadas. De manera similar, el anticuerpo se puede conjugar a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno se puede detectar usando un anticuerpo anti-hapteno marcado.

Los expertos en el arte sabrán que estas y otras marcas adecuadas se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estas marcas a los anticuerpos o fragmentos del mismo se pueden lograr empleando técnicas estándar comúnmente conocidas por los expertos en el arte. Las técnicas típicas son descritas por Kennedy, J. H., y cols., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M., y cols. 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en esta última son el método del glutaraldehído, el método del peryodato el método de la dimaleimida y otros, los cuales se incorporan aquí como referencia.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, donde el anticuerpo es marcado de manera indirecta por reactividad con un segundo anticuerpo que ha sido marcado con una marca detectable. El segundo anticuerpo es con preferencia uno que se une a los anticuerpos del animal del cual se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el

segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se usa en el ensayo que se describe a continuación, esta marca es con preferencia una microesfera recubierta con anticuerpo, particularmente una microesfera magnética. Para el anticuerpo policlonal que se emplea en el inmunoensayo aquí descrito, la marca es con preferencia una molécula detectable tal como una sustancia radioactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

Dentro del alcance de la invención, también se puede emplear un sistema de doble anticuerpo alternativo, al que con frecuencia se hace referencia como sistemas de formato rápido ya que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito. El sistema requiere alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de la proteína amiloide se determina usando un par de anticuerpos, cada uno específico para la proteína amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos se menciona en la presente memoria como un "anticuerpo detector" y el otro de dicho par de anticuerpos se menciona en la presente memoria como un "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar tanto como anticuerpo de captura como anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar también como anticuerpo de captura y anticuerpo detector, juntos en un único ensayo. Por ende, una realización de la presente invención usa el método sándwich del doble anticuerpo para detectar la proteína amiloide en una muestra de un fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se coloca a modo de sándwich entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, siendo el anticuerpo de captura inmovilizado de manera irreversible en un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría una marca detectable, con el fin de identificar la presencia del sándwich anticuerpo-analito y de este modo la presencia del analito.

Ejemplos de sustancias en fase sólida incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, microesferas magnéticas, plásticas o de vidrio y portaobjetos que son bien conocidos en el campo de radioinmunoensayo e inmunoensayo de enzima. Los métodos para acoplar anticuerpos en fases sólidas también son bien conocidos por los expertos en el arte. Más recientemente, se han empleado varios materiales porosos como soportes sólidos tales como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

La presente invención también se refiere un kit diagnóstico para detectar la proteína amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se definió anteriormente. Adicionalmente, la presente invención se refiere a este último kit diagnóstico el cual, además de una composición como se definió anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se definió anteriormente. El término "kit diagnóstico" se refiere en general a cualquiera de los kit diagnósticos conocidos en el arte. Más específicamente, el último término se refiere a un kit diagnóstico como se describe en Zrein y cols. (1998).

Es otro objeto de la presente invención proporcionar nuevas sondas inmunológicas y kits de ensayos para la detección y el diagnóstico enfermedades y condiciones asociadas con amiloide que comprenden anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Para las sondas inmunológicas, los anticuerpos se unen en forma directa o indirecta a una molécula reportera adecuada, e.g., una enzima o radionucleido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos de acuerdo con la presente invención e instrucciones para uso de los anticuerpos con el propósito de unirse a la proteína amiloide para formar una complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

EJEMPLOS

Materiales

El desarrollo y preparación de anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado “mC2” y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se describe en la solicitud copendiente EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005, cuya revelación se incorpora aquí como referencia.

Las células de hibridoma FP-12H3-C2, que producen el anticuerpo monoclonal de ratón ACI-01-Ab7C2 (denominado “mC2”y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se depositaron el 1 de Diciembre de 2005 en la solicitud copendiente EP05027092.5 con el “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest y se le dio el número de acceso DSM ACC2750.

Las células de hibridoma se cultivaron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino 10% y antibióticos (Penicilina/Estreptomicina). Se evaluó el isotipo del anticuerpo producido y se encontró que era IgG2b/kappa de ratón, como se esperaba.

Ensayo

Un ELISA de unión a Amiloide Beta proporcionó una medida confiable de la potencia de los anticuerpos C2. Anticuerpos de control positivo, anticuerpo FP-12H3-C2 murino (Genovac Lote No.: AK379/01), y anticuerpo estándar 1560 de Chemicon (Lote No.: 0508008791).

Selección de las regiones constantes humanas

Dado que el reclutamiento del sistema inmune no es deseable para el candidato clínico de anticuerpo, la región constante humana seleccionada para la cadena pesada era IgG4 humana, modificada para cambiar Serina en la posición 228 en la región biagra a Prolina (HuIgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro intercadena y previene la formación de medias moléculas que puede ocurrir en las preparaciones de IgG4 humana nativa. Al anticuerpo expresado a partir de las líneas celulares de producción también se le había removido la lisina terminal. Las secuencias de las regiones constantes humanas HuIgG4 Ser-Pro y Kappa humana son dadas en las SEC ID NO: 17 y 14, respectivamente.

Ejemplo 1 Clonación y Secuenciación de las Regiones Variables del Anticuerpo

El ARN total se preparó a partir de células de hibridoma 3 x 10^6 (un recipiente T175) usando el mini kit RNeasy de Qiagen (Cat No.: 74104). El ARN se eluyó en 50uL de agua y se evaluó en un gel de agarosa 1.2%. El medio acondicionado de las células se retuvo y se usó una muestra para evaluarla en el ensayo de actividad de anticuerpo.

Los cADNs V_H y V_K se prepararon usando transcriptasa reversa con los cebadores IgG de ratón y región constante κ. Las primeras hebras de cADNs se amplificaron mediante PCR usando un gran conjunto de cebadores de secuencia señal. Los ADNs amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGem® T Easy (Promega). Se hizo una selección en los clones V_H y V_K obtenidos, para los insertos del tamaño esperado mediante PCR y la secuencia de ADN de los clones seleccionados se determinó mediante secuenciación automatizada de ADN. Se

determinaron las ubicaciones de las regiones determinantes complementarias (CDR, por sus siglas en inglés) en las secuencias, con referencia a otras secuencias de anticuerpos (Kabat EA y cols., 1991). A lo largo de esta solicitud, se usa la convención de numeración de Kabat para las regiones variables de anticuerpo; por lo tanto los números de los residuos puede diferir del número linear estricto.

La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida para mC2 V_K se muestra en las SEC ID No.: 29 y 27, respectivamente. Cuatro clones dieron esta secuencia productiva idéntica. En varios clones, también se encontró una secuencia V_K no productiva aberrante que surge de la pareja de fusión de hibridoma.

Para mC2 V_H, se aislaron dos secuencias productivas diferentes. La secuencia mC2 V_H AF (ver SEC ID No.: 30) se encontró en un total de 29 clones, con 14 cambios de par de base sencilla en los clones individuales. La secuencia mC2 V_H B se encontró en un total de 8 clones. Cinco de estos representaron la secuencia mayoritaria, siendo los ostros 3 clones variaciones de ésta. Es posible que estas secuencias similares V_HB surjan como un artefacto de la amplificación por PCR. También se obtuvo una V_H no productiva aberrante a partir del hibridoma C2 y se atribuye a la unión V-D-J defectuosa.

Con el fin de determinar cuál es la mC2 V_H activa correcta, se prepararon dos anticuerpos quiméricos con las dos secuencias V_H diferentes, AF y B, combinadas con mC2 V_K, para evaluar la actividad de anticuerpo correcta.

Ejemplo 2 Construcción de los Genes de Anticuerpos Quiméricos

Un anticuerpo quimérico humano en su forma más común consiste de regiones constantes humanizadas unidas a regiones variables murinas (u otras no humanas). Un anticuerpo quimérico provee una herramienta muy útil, en primera medida para la confirmación de que se han identificado las regiones variables correctas, en segundo lugar, para su uso como un anticuerpo de control en ensayos de unión de antígeno con el mismo efecto o funciones y usando los mismos reactivos secundarios de detección que un anticuerpo humanizado o producido mediante ingeniería, y también puede ser usado para investigar la farmacocinética y otras propiedades de las regiones constantes humanas con referencia al objetivo particular del anticuerpo.

Se construyeron dos vectores de expresión quiméricos de cadena pesada que consisten de las regiones variables mC2 V_H B o mC2 V_H AF unidas a la región constante HuIgG4 (Ser-Pro) en el vector de expresión *pSVgpt*. Este se basa en *pSV$_2$gpt* (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células de mamífero, la región potenciadora de inmunoglobulina murina de cadena pesada, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y las secuencias SV40 poli A. La región variable de cadena pesada para la expresión se inserta como un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Se construyó un vector quimérico de cadena liviana que consiste de C2 VK unido a la región constante humana C Kappa en el vector de expresión pSVhyg. (Hieter PA y cols., 1980) el pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *hyg* para la selección en células de mamífero, la región potenciadora de inmunoglobulina murina de cadena pesada, la secuencia genómica que codifica la región constante kappa y que incluye las secuencias SV40 poli A y potenciadora kappa. La región variable de cadena liviana para la expresión se inserta como un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Los cassettes de expresión para las secuencias murinas C2 VH y VK se construyeron mediante la adición de la secuencia flanqueadora 5’ incluyendo el péptido de señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulina murina, y la secuencia flanqueadora 3’ que incluye el sitio de empalme y la secuencia del intrón, usando los vectores VH-PCR1 y VK-PCR1 como plantillas (Riechmann y cols., 1988). Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para VH y VK en los vectores de expresión quiméricos. En las Figuras 1 y 2 se muestran el ADN y las secuencias de aminoácidos de los genes VH y VK en los cassetes de expresión.

Ejemplo 3 Expresión de Anticuerpos Quiméricos

3.1 Expresión en líneas celulares estables

La línea celular huésped para la expresión del anticuerpo era NS0, una no inmunogobulina que produce mieloma de ratón, obtenida de European Collection of Animal Cell Cultures, Porton UK (ECACC No 85110503). Los vectores de expresión de cadena pesada y liviana fueron co-transfectados en células NS0 mediante electroporación. Se seleccionaron las colonias que expresaban el gen *gpt*, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con

suero fetal bovino (FBS) 10%, ácido micofenólico 0.8 ug/mL y xantina 250 ug/mL. Se hizo una selección de los clones de células transfectadas buscando la producción del anticuerpo humano mediante ELISA para IgG humana. Se realizó la expansión de las líneas celulares que secretaban el anticuerpo y las mayores productoras se seleccionaron y congelaron en nitrógeno líquido. Para cada anticuerpo, se realizó la expansión de las líneas celulares que más producían en un medio como el anterior, pero con solo FBS 5%. Los anticuerpos quiméricos se purificaron usando Prosep®-A (Bioprocessing Ltd). Para el anticuerpo IgGκ humano, se determinó la concentración mediante ELISA. Los anticuerpos también se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.2 Expresión transiente de anticuerpos quiméricos

Para agilizar la evaluación de los diferentes anticuerpos quiméricos, se uso la expresión transiente para producir rápidamente pequeñas cantidades de sobrenadante de células conteniendo el anticuerpo recombinante para las pruebas. Se transfirieron los cassettes de expresión mC2 V_H y V_K a los vectores basados en pcDNA3.1 (Invitrogen) para la expresión transiente. El vector de cadena pesada incluía una región constante de IgG humana. El vector de cadena liviana incluía una región constante kappa humana. Se transfectaron tanto mC2 V_H AF como mC2 V_H B con mC2 V_K en células embrionarias de riñón humano (HEK 298) con el reactivo Lipofectamina 200 (Invitrogen Cat No.: 11668) de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. Se hizo la recolección de células del medio acondicionado, 3 días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgG_K humano.

Ejemplo 4 Actividad de los Anticuerpos Quiméricos C2

4.1 Actividad de los anticuerpos quiméricos C2 producidos mediante transfección transiente.

Para los dos anticuerpos quiméricos diferentes, se evaluó la unión a Amiloide Beta en muestras de medio acondicionado de la transfección transiente usando ELISA. Los resultados indican claramente que la secuencia C2 VH AF es la secuencia correcta. El anticuerpo quimérico C2 V_H AF/C2 V_K se une bien en el ensayo, pero el C2 V_H B/C2 V_K no muestra ninguna unión en lo absoluto. El anticuerpo de control murino Chemicon 1560 mostró una buena unión, pero la unión mediante el anticuerpo murino purificado C2 suministrado era baja. Debe

notarse que se usó un anticuerpo secundario diferente para los anticuerpos murinos con las regiones constantes de ratón, en comparación con los anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas, por lo que los resultados no son directamente comparables. Posteriormente, se encontró que el medio acondicionado del hibridoma C2 dio un buen resultado en el ensayo.

4.2 Actividad de los anticuerpos quiméricos purificados C2

Los dos anticuerpos C2 quiméricos diferentes se purificaron a partir de líneas celulares NS0 estables como se describió y se evaluaron usando ELISA de Amiloide Beta. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados obtenidos con el anticuerpo expresado de manera transiente. El anticuerpo C2 ChVH AF/ChVK se une bien en el ELISA y el anticuerpo C2 ChVH B/ ChVK no se une en lo absoluto.

Ejemplo 5 Diseño de Genes de Anticuerpo C2 Humanizado

Se compararon las secuencias de aminoácidos de mC2 V_H y V_K con las secuencias de anticuerpo de roedor V_H y V_K en las bases de datos NCBI y Kabat.

5.1 Región variable de cadena liviana

El gen de línea germinal de ratón de mayor similitud a mC2 V_K es bb1, Locus MMU23120, (Schable *y cols., 1999*). Solo dos aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, ambos ubicados dentro de la CDRL1. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con secuencia similar, pero no idéntica. Muchos tienen una CDRL2 idéntica y una CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de mC2 parece ser única. El mC2 V_K puede asignarse al subgrupo Kabat MuV_KII. La posición 87 de mC2 V_K es F en vez de Y, que es más común en el subgrupo, lo que indica que este residuo del marco puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_K de de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_KII son la mejor coincidencia para mC2 V_K (Cox y cols., 1994). Se seleccionaron la secuencia DPK15 junto con la región J humana HuJ_K1 para proveer las secuencias marco aceptoras para el V_K humanizado.

Se diseñaron cuatro secuencias V_K humanizadas. C2HuVK1 consiste de CDRs mC2 V_K con marcos de DPK 15 y J_K1 humana. En las versiones 2, 3 y 4 se han sustituido los residuos murinos en el marco en las posiciones 45 u 87 o ambos. El residuo 45 puede estar involucrado en el soporte de la conformación de las CDRs. El residuo 87 se localiza en la interfase de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto,

estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión a anticuerpos. Las posiciones y cambios que se han realizado en las regiones marco de cadena liviana se muestran en la Tabla 6. Una comparación de las secuencias humanizadas con la secuencia mC2 V_K, y con DPK15 y J_K1 humana.

5.2 Región variable de cadena pesada

El gen de línea germinal de ratón de mayor similitud a mC2 V_H AF es VH7183, Locus AF120466, (Langdon *y cols., 2000*). La comparación se muestra en la Figura 3. Nueve aminoácidos difieren de esta secuencia de línea germinal, estando la mayoría ubicados dentro de la CDR2. Se encuentran anticuerpos murinos maduros con CDR1 similar (un residuo diferente) o con CDR2 similar (un residuo diferente), pero ninguno con las tres CDRs idénticas a mC2 V_H AF. La CDR3 del anticuerpo mC2 es inusualmente corta, consistiendo de solo tres residuos. Sin embrago, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con una CDR3 de esta longitud. Puede asignarse mC2 V_H AF al subgrupo Kabat Mu V_HIIID. El residuo 47 de mC2 V_H es L en vez del W más común, y el residuo 94 es S en lugar del R normal, lo que indica que estos residuos del marco pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_H de línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_HIII son la mejor coincidencia para mC2 V_H. Se seleccionó la secuencia DP54 junto con la región J humana HuJ_H6 para proveer las secuencias marco aceptoras para el V_H humanizado.

Se diseñaron cuatro secuencias V_H humanizadas. C2HuVH1 consiste de CDRs mC2 V_H AF con marcos de DP54 y HuJ_H6. En las versiones 2, 3 y 4 se han sustituido los residuos murinos en el marco en las posiciones 47 ó 94 o ambos. El residuo 47 en el marco 2 hace contacto tanto con las CDRs como con el dominio V_K. El residuo 94 puede estar involucrado en el soporte de la conformación de las CDRs. Por lo tanto, estos residuos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión a anticuerpos.

Las posiciones y cambios que se han realizado en las regiones marco de cadena pesada se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 6. Construcción de Genes de Anticuerpo Humanizado

Las regiones variables se construyeron mediante el método del solapamiento de la recombinación por PCR. Los cassettes de expresión para el anticuerpo

quimérico, C2 Ch V_H AF y C2 Ch V_K, se usaron como plantillas para la mutagénesis de las regiones marco para las secuencias requeridas. Se sintetizaron juegos de pares de cebadores mutagénicos que abarcaban las regiones a ser alteradas. Los cassettes de expresión humanizados V_H y V_K producidos se clonaron en pUC19 y se confirmó que la secuencia entera de ADN era correcta para V_H y V_K. Se hizo la escisión de los genes modificados de región V de cadena pesada y liviana a partir de pUC19 como los cassettes de expresión HindIII a BamHI. Estos se transfirieron a los vectores de expresión pSV*gpt* y pSV*hyg* los cuales incluyen regiones constantes IgG4 Ser-Pro o κ respectivamente, como para los vectores de anticuerpos quiméricos. Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Ejemplo 7 Expresión de Anticuerpos Humanizados

7.1 Expresión en líneas celulares estables

Los vectores de expresión humanizados de cadena pesada y liviana se co-transfectaron en células NS0 mediante electroporación, como para la expresión de anticuerpos quiméricos. Las líneas celulares que producen anticuerpos se seleccionaron y se expandieron y se purificaron los anticuerpos humanizados, exactamente como para el anticuerpo quimérico. Los anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE.

7.2 Expresión transiente de anticuerpos humanizados

Para agilizar la evaluación de los diferentes constructos humanizados V_H y V_K, también se transfirieron los cassettes de expresión C2 humanizados V_H y V_K a los vectores para la expresión transiente descritos en la sección 7.2. Los cuatro constructos humanizados C2 V_K se co-transfectaron con el constructo quimérico C2 V_H en células HEK 293. De manera similar, se co-transfectaron los cuatro constructores humanizados C2 V_H con el constructo quimérico C2V_K en células HEK293. Se hizo la recolección de células del medio acondicionado, 3 días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó mediante ELISA para el anticuerpo IgG_K humano.

Ejemplo 8 Actividad de los Anticuerpos Humanizados C2

8.1 Actividad de los anticuerpos humanizados C2 producidos mediante transfección transiente.

Se evaluaron muestras de medio acondicionado de la transfección transiente usando ELISA de Amiloide Beta. Los resultados obtenidos indican claramente que las versiones 2 y 4 de los constructos VH humanizados C2HuVH AF son funcionales al ser combinadas con la cadena quimérica de C2 kappa, y son comparables al anticuerpo quimérico C2 en el ensayo. En contraste, los anticuerpos que contenían las versiones 1 y 3 de C2HuVH AF combinadas con la cadena quimérica de C2 kappa no mostraron ninguna unión en el ensayo. Esto indica que la sustitución del residuo murino en la posición 94 es esencial para la actividad del anticuerpo. Los anticuerpos que contenían la cadena pesada quimérica de C2 combinada con las cuatro cadenas de humanizadas de C2 kappa mostraron todas una buena unión, comparable al anticuerpo quimérico en el ELISA.

8.2 Actividad de los anticuerpos humanizados purificados C2

Se purificaron ocho anticuerpos C2 humanizados diferentes que comprendían todas las combinaciones de dos cadenas pesadas humanizadas y cuatro cadenas livianas humanizadas a partir de líneas celulares NS0 estables como se describió y se evaluaron usando ELISA de Amiloide Beta (Figura 4).

Los resultados obtenidos indican claramente que los anticuerpos C2HuVH 4 se desempeñan mejor en el ensayo que los anticuerpos C2HuVH2. De los anticuerpos C2 HuVH2, el C2 HuVH2/HuVK3 muestra la mejor actividad de unión, pero ésta es aproximadamente dos veces reducida en comparación con el anticuerpo quimérico de control C2 ChVHAF/ChVK. La actividad del C2 HuVH2/HuVK2 es de cuatro a cinco veces reducida en comparación con el control. Las actividades de los anticuerpos que comprenden C2HuVH4 con las cuatro cadenas livianas humanizadas diferentes son similares. Se observa la mayor actividad para C2HuVH4/HuVK1 y todos los cuatro anticuerpos están cercanos al anticuerpo quimérico de control en el ensayo.

Ejemplo 9 Modificaciones a CDRL2

9.1 Diseño de Cadena liviana con CDR 2 modificada

Como se anotó anteriormente, muchos anticuerpos comparten la misma secuencia CDRL2 (“KVSNRFS”) del anticuerpo C2. Se decidió evaluar si era posible modificar levemente CDRL2 sin afectar de manera adversa la actividad del anticuerpo. Se seleccionaron dos sustituciones conservativas: R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias alternativas de

CDRL2 son por lo tanto “RVSNRFS” y “KVSSRFS”. Estas se incorporaron en la secuencia V_K murina sin ningún otro cambio, como mC2 VK-R y mC2 VK-S respectivamente.

9.2 Expresión transiente del anticuerpo modificado CDRL2

Los dos constructos de C2 de cadena liviana con CDRL2 modificado descritos en la Sección 11.2.1 se clonaron en el vector de cadena liviana para la expresión transiente. Cada uno se co-transfectó con el vector quimérico C2 V_H en células HEK293. Se recolectaron las células en el medio acondicionado, tres días después de la transfección. Se determinó la cantidad de anticuerpo producido mediante ELISA para el anticuerpo IgGκ.

9.3. Actividad del anticuerpo C2 con CDRL2 modificado

Se evaluaron las muestras de medio acondicionado de la transfección transiente de mC2 V_Ks con CDRL2 modificado combinado con mC2 V_H en ELISA de Amiloide Beta (Figura 5). Tanto el anticuerpo VK-R como el VK-S son comparables al anticuerpo quimérico C2, lo que indica que las modificaciones individuales al CDRL2 seleccionadas no afectan de manera marcada la actividad del anticuerpo en el ensayo.

Ejemplo 10 Determinación de la Afinidad

Para evaluar la afinidad y especificidad de unión de anticuerpos quiméricos (AF) y humanizados (H4K1; H4K4) de ratón (ACI-01-Ab-7-C2), se realizó un análisis de BIACORE.RTM usando monómeros y fibras de amiloide beta 1-42 como antígeno inmovilizados en un chip CM5. La tecnología de BIACORE.RTM utiliza cambios en el índice de refracción en la capa superficial tras la unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado en la capa. La unión es detectada mediante resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) de la luz laser que es refractada desde la superficie. El análisis de la cinética de la señal de asociación y disociación permite discriminar entre la interacción específica y la no específica. La concentración de anticuerpo usada estaba en el rango de 0.05 μM a 1.0 μM.

Tabla 1: Afinidad y especificidad de unión de anticuerpos quiméricos (AF) y humanizados (H4K1; H4K4) de ratón (ACI-01-Ab-7-C2) a monómeros y fibras de amiloide beta 1-42

	Monómeros			Fibras		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 de ratón	1.8 E+04	2.7 E-03	1.5 E-07	2.4 E+04	9.9 E-04	4.1 E-08
AF Quimérico	4.7 E+04	9.5 E-04	2E-08	5.1 E+04	3.3 E-04	6.5 E-09
H4K1 humanizado	5.0 E+04	9.5 E-04	1.9 E-08	4.9 E+04	2.3 E-04	4.7 E-09
H4K4 humanizado	2.5 E+04	4.4 E-04	1.8 E-08	1.3 E+05	3.0 E-04	2.3 E-09

Ejemplo 11 Ensayo Inmunohistoquímico de Unión

11.1 Secciones de cerebro humano

Se obtuvieron cerebros de pacientes sanos, no dementes pre-AD y AD en la Universitätsklinik en Bonn tras la aprobación ética. Se fijaron los cerebros en formaldehído y se deshidrató la región del hipocampo, se sumergió en parafina y se cortaron secciones de 5 um con una microtoma. Se almacenaron las secciones de parafina a TA hasta el momento de su uso. Para el material fresco, se cortaron criosecciones de 5 um con un criostato y se almacenaron las secciones a -80°C hasta su uso.

11.2 Inmunohistoquímica

Las secciones de parafina se desparafinaron y se rehidrataron mediante portaobjetos de lavado en xileno seguido de etanol 100%, etanol 90% y etanol 70%. La señal de fondo disminuyó con 30 minutos de incubación en H_2O_2 10%, metanol 10% en agua. La recuperación de antígeno se obtuvo incubando los portaobjetos en ácido fórmico 100% durante 3 minutos. Después de tres lavados en solución salina amortiguada con Tris (TBS, pH 7.5), se bloqueó la marcación no específica por incubación de los portaobjetos durante 2 horas en BSA 10%, Triton X-100 0.25% en TBS. Después del lavado (3 lavados en TBS), se llevó a cabo el bloqueo de los anticuerpos endógenos adicionando una IgG anti-humana no marcada (Biomeda) e incubando los portaobjetos en cámaras húmedas durante toda la noche a TA. Después de otros 3 lavados, se adicionó el anticuerpo antiamiloide humano principal a los portaobjetos y se incubó otras 24 horas a TA. Después del lavado, se adicionó IgG secundaria antihumana marcada con fosfatasa alcalina (Sigma) a los portaobjetos y se incubaron durante 2 horas a

TA. Después del lavado, se desarrollaron los portaobjetos con Rojo Líquido permanente (Dakocytomation), se lavaron con agua y se secaron con aire antes de montarlo con medio de montaje permanente (corbitbalsam).

La criosección se fijó en metanol durante 30 minutos a -80°C y se disminuyó la señal de fondo adicionando H_2O_2 al metanol frío hasta una concentración final de 10% e incubándola durante 30 minutos a TA. Después de 3 lavados en solución salina amortiguada con Tris (TBS, pH 7.5), se bloqueó la marcación no específica mediante una incubación de luna vecina durante 2 horas en BSA 10%, Triton X 100 0.25% en TBS como se indicó anteriormente y se llevó a cabo el mismo proceso de tinción mencionado anteriormente.

Las secciones se examinaron con un microscopio Leica DMLB y se fotografiaron usando una cámara Leica DC500 y un software Leica FireCam 1.2.0.

Placas marcadas con anticuerpos humanos A y C de cerebros de pacientes con la enfermedad AD (Figura 6).

Se marcaron las placas difusas. Adicionalmente, también pueden detectarse las placas difusas en pacientes con AD no dementes mediante los anticuerpos A y C. Se marcó la proteína amiloide en angiopatía amiloide cerebral (CAA) con ambos anticuerpos y también se detectó alguna tinción de las neuronas lo que podría corresponder a amiloide intracelular. No se vió ninguna marcación en los cerebros control de pacientes saludables. Pueden detectarse las placas en las secciones de parafina pretratadas con ácido fórmico pero no se marcaron las placas en las secciones de parafina sin pretratamiento con ácido fórmico y en criosecciones fijadas en metanol. El anticuerpo B humano no detectó placas en las secciones de parafina y el anticuerpo de ratón no realizó la tinción de las secciones de parafina o las criosecciones de cerebros humanos.

<u>Abreviaturas</u>:

A= anticuerpo quimérico de unión AF (IgG4) (mC2ChVHAF)

B= anticuerpo quimérico B que no se une (IgG4) (mC2VHB)

C= anticuerpo humanizado de unión H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

Ratón= anticuerpo de ratón ACI-01-Ab-C2 (IgG2b)

Ejemplo 12: Funcionalidad del mC2 en las fibras amiloideas

12.1 Modificación de la conformación de las fibras Aβ1-42 e iniciación de la desagregación después de la unión del anticuerpo mC2

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual el anticuerpo es capaz de desagregar fibras preformadas amiloide beta ($A\beta_{1-42}$), se realizó una comparación punto a punto del ensayo de Tioflavina-T (Th-T) fluorescente, midiendo la desagregación y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido de U-^{13}C Tirosina10 y péptido Aβ1-42 marcado en la Valina12 analizando la conformación secundaria. El anticuerpo mC2 solubilizó el 35,4 % de las fibras preformadas Aβ1-42 e indujo simultáneamente un cambio en la conformación secundaria de la hoja beta a enrollada aleatoriamente. La reducción de la población de la conformación hoja beta con respecto a la enrollada aleatoriamente es del orden del 35% y se encuentra por lo tanto en estrecha concordancia con la que se mide usando el ensayo de fluorescencia Th-T. Estos datos indican que la unión del anticuerpo mC2 inicia una transición de la estructura secundaria, lo que causa **potencialmente** una desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las hojas beta que afectan una ruptura de las fibras elongadas en fragmentos más pequeños.

12.2 Afinidad de unión dependiente de la conformación del anticuerpo m C2

Dado que es bien conocido en la bibliografía científica que una proporción de la energía de unión anticuerpo-antígeno se puede usar para una modificación dependiente de energía de la conformación de un antígeno (Blond y Goldberg, 1987), se realizó un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo C2 a la proteína $A\beta_{1-42}$ total y a un péptido más pequeño de nueve aminoácidos de largo que comprende el epítope del anticuerpo (Figura 8). Para esta comparación, se analizaron las afinidades del anticuerpo C2 humanizado mediante ELISA usando péptidos biotinilados que cubren la secuencia completa de aminoácidos de los epítopes de C2 (producidos por Mimotopes y comprados en ANAWA Trading SA) y un péptido $A\beta_{1-42}$ completo biotinilado (Bachem). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Como se demuestra en la Figura 8 y en la Tabla 2, el anticuerpo se une con un 36,0% de mayor afinidad al péptido que comprende su epítope específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia de $A\beta_{1-42}$) que a la proteína Aβ1-42 completa. En consecuencia, se sugiere que la diferencia de energía de la afinidad de unión se usó para la transición con consumo de energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable

para la interacción del anticuerpo. Esto puede explicar por qué la afinidad del anticuerpo es menor para la proteína nativa (la proteína amiloide completa) que para la subunidad aislada.

Tabla 2

	O.D	
	amiloide Beta 13 - 21	amiloide Beta 1 – 42
hC2	**1.225**	**0.9005**
IgG de control	**0.171**	**0.196**

Ejemplo 13: Efectos del hC2 anti-amiloide en la agregación del péptido amiloide beta 1 - 42

Para evaluar la habilidad del anticuerpo monoclonal humanizado de amiloide beta anti-humano hC2 para mediar los efectos de desagregación y anti-agregación sobre el amiloide beta (Aβ) se llevó a cabo un ensayo de espectrofluoresencia con tioflavina T.

13.1 Ensayo de inhibición de agregación

Se reconstituyó un polvo liofilizado de Aβ1-42 en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta una concentración 1mM. La solución del péptido se sometió a ultrasonido durante 15 min a temperatura ambiente, se agitó durante toda la noche, y se tomaron alícuotas en tubos de microcentrífuga no siliconados. Posteriormente se evaporó el HFIP bajo una corriente de argón. El péptido resultante se secó al vacío durante 10 min y se almacenó a -80°C hasta el momento de usarlo. Para evaluar la inhibición de la agregación de Aβ1-42 mediada por anticuerpo, se prediluyó el anticuerpo hC2 en PBS y, en un tubo de incubación no siliconado, se preparó una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes: anticuerpo diluido 3.3 ó 0.33 uM, tioflavina T 10 uM, Aβ1-42 33 uM y DMSO 8.2%. Por lo tanto, las relaciones molares finales de anticuerpo a Aβ1-42 eran 1:10 y 1:100. Adicionalmente, se prepararon soluciones control apropiadas. Posteriormente se incubaron las soluciones durante 24 hrs a 37°C, y se leyó la espectrofluoresencia (unidades de fluoresencia relativas; RFU) en seis replicas en cajas negras de 384 pozos (Perkin-Elmer) en un espectrofluorometro FluoroCount de Perkin-Elmer. Posteriormente se midió la espectrofluoresencia y se calculó el % de desagregación como se describe más abajo.

13.2 Ensayo de desagregación

Para evaluar la desagregación de Aβ1-42 preagregado mediada por anticuerpos, se preparó una solución 110uM de Aβ1-42 de bajo peso molecular, preparado como se describió anteriormente, en DMSO 27% y PBS (1x). Posteriormente se permitió la agregación de esa solución a 37°C durante 24 horas tras lo cual se adicionó lo siguiente: anticuerpo prediluido 3.3 ó 0.33 uM y tioflavina T 10 uM. Esto dio como resultado una relación molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo a Aβ1-42. Se incubó esta solución durante 24 horas adicionales a 37°C. Posteriormente se midió la espectrofluoresencia y se calculó el % de desagregación como se describe a continuación.

13.3 Cálculo

La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como porcentaje promedio de inhibición o desagregación, respectivamente, ± error estándar de la media (SEM) de acuerdo con la siguiente ecuación:

% de inhibición = (RFU de control pos – RFU de control neg) – (RFU de muestra con Aβ1 – 42 – RFU de muestra sin Aβ1 – 42) x 100% / (RFU de control pos – RFU de control neg)

13.4 Resultado

13.4.1 *Inhibición de la agregación de Aβ1-42*

En la Tabla 3 y en la Figura 16 se muestra la inhibición de la agregación de Aβ1-42 usando el anticuerpo hC2. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 la inhibición fue en promedio de 30% (2 experimentos independientes), mientras que a una relación molar de 1:10 la inhibición fue 80% (2 experimentos independientes, ver Tabla 3).

Tabla 3. Inhibición de la agregación de Aβ1-42 mediada por hC2 a una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 y 1:10

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30.0 ± 4.1 %	80.4 ± 6.9 %

13.4.2 Desagregación de Aβ1-42 pre-agregada

En la Tabla 4 y la figura 17 se muestra la desagregación de Aβ1-42 pre-agregada usando el anticuerpo hC2. A una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:100 la desagregación fue en promedio de 24%, mientras que a una relación molar de 1:10 la desgregación fue 32% (3 experimentos independientes, ver Tabla 4).

Tabla 4. Desagregación de Aβ1-42 pre-agregada mediada por hC2 a una relación molar de anticuerpo a Aâ1-42 de 1:100 y 1:10

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	23.9 ± 4.4 %	31.9 ± 3.5 %

Usando el ensayo de tioflavina T, pueden demostrarse las propiedades bifuncionales del anticuerpo humanizado anti-Aβ hC2, a saber, inhibir la agregación de Aβ1-42 en conformación patogénica protofibrilar y adicionalmente desagregar protofibrilos de Aβ1-42 preformados. El hC2 inhibió la agregación de Aβ1-42 en 80% a una relación molar de anticuerpo a Aβ1-42 de 1:10. Se mostró que la habilidad del hC2 para desagregar protofibrilos preagregados de Aβ1-42 a una relación molar de 1:10 era 32%.

Ejemplo 14: Unión específica a conformación del mC2 a diferentes clases de proteína amiloide

Con el fin de evaluar la especificidad del mC2 a diferentes estadíos de la proteína amiloide polimerizada, monomérica, polimérica soluble y amiloide fibrillar, se realizó un ELISA recubierto con estos diferentes estadíos de amiloide-beta polimérica (Figura 9). Los monómeros se prepararon de acuerdo con un método modificado publicado por (Klein, 2002), amiloide beta polimérico soluble, de acuerdo con (Barghorn y cols., 2005), mientras que las fibras se preformaron mediante incubación de amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final de 1µg/µl en Tris/HCl pH 7,4 a 37°C durante 5 días seguido de un paso de centrifugación (10000 rpm durante 5 minutos). Posteriormente los polímeros de amiloide se recubrieron en las placas de ELISA con una concentración final de 55µg/ml y se realizó una prueba de afinidad de unión ELISA usando un anticuerpo monoclonal IgG anti-ratón (Jackson) marcado con fosfato alcalino. Como se demuestra en la Tabla 5, el anticuerpo mC2 se une con mayor afinidad a la proteína ß amiloide polimérica soluble que a las fibras y con la menor afinidad a los monómeros. Estos datos indican que la unión del anticuerpo está influenciada por el epitope amiloide y por la conformación de los diferentes agregados amiloideos.

Tabla 5 Unión específica a conformación del mC2 a fibras, monómeros, y oligómeros amiloideos

mC2	**O.D**		
Ab Conc (ug/mL)	Oligómero	Fibras	Monómeros
0.625	2.806	1.620	1.155
0.312	1.724	0.989	0.649
0.156	1.036	0.631	0.397
0.078	0.652	0.499	0.333

Ejemplo 15: Mapeo del epitope del anticuerpo monoclonal hC2 de AC Immune

El mapeo del epitope del anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se realizó por ELISA usando tres genotecas de péptidos diferentes. Una genoteca comprendía un total de 33 péptidos biotinilados que cubrían la secuencia completa de aminoácidos (aa) de Aβ1-42 (producida por Mimotopes y comprada en ANAWA Trading SA), la segunda genoteca contiene péptidos biotinilados que usan el péptido 12 (aa12-20 de Aβ) proveniente de la primera genoteca de péptidos y sustituye cada aa de la secuencia por una alanina (ver la Tabla 8 abajo), y la tercera genoteca contiene los péptidos biotinilados 13, 14, ó 15 (aa 13-21, 14-22 ó 15-23 de Aβ) y sustituyendo en cada caso los últimos aminoácidos con una alanina o una glicina para el aa 21 que ya es una alanina (ver tabla 9 más abajo). Un péptido biotinilado Aβ1-42 completo se usó como control positivo (Bachem). El mapeo del epitope se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) se bloquearon con BSA 0,1% en PBS durante toda la noche a 4°C. Después del lavado con PBS-Tween 20 0,05%, las placas se recubrieron durante 1 hora a TA con los diferentes péptidos de la genoteca, se diluyeron en BSA 0,1% , azida sódica 0,1% en PBS hasta una concentración final de 10 µM. Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo hC2 o un anticuerpo quimérico de unión IgG4 no Aβ diluido hasta 200 ng/mL en BSA 2%, azida sódica 0,1% en PBS. Las placas se lavaron otra vez y se incubaron con IgG de anti-humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1h a TA. Después del lavado final, las placas se incubaron con el sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm con un lector de placas de ELISA.

Se demostró que el anticuerpo monoclonal humanizado hC2 se unió específicamente a los péptidos 12, 13, 14 y 15 de la primera genoteca de péptidos. Estos péptidos comprenden los aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 y 16-24 respectivamente de Aβ1-42 lo cual sugiere que el epitope se halla en la región de

12-24 de Aβ. Una segunda genoteca con sustituciones de alanina se usó para determinar los aa críticos para la unión al péptido Aβ12-20 (VHHQKLVFF). La unión del anticuerpo hC2 se pierde completamente cuando los aa 16, 17, 19 ó 20 son sustituidos por una alanina, lo que indica que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a Aβ. La unión del anticuerpo hC2 se pierde parcialmente cuando se sustituyen los aa 15 y 18.

La unión también se perdió casi por completo cuando el aa 14 se sustituyó con una alanina, lo que indica que el aa 14 es también muy importante para la unión.

Finalmente, se usó una tercera genoteca para determinar si los aa 21, 22 o 23 son críticos para la unión del epitope. La unión del anticuerpo a los aa 15-23 se redujo cuando el aa 23 se sustituyó con una alanina, lo cual indica que el aa 23 es también importante para la unión. La unión se perdió parcialmente cuando el aa 21 se sustituyó con una glicina y se perdió de manera leve cuando el aa 22 se sustituyó con una alanina.

Ejemplo 16: Neuroprotección por el Anticuerpo hC2

Se evaluó la habilidad del anticuerpo hC2 para proteger las neuronas de la degeneración inducida por oligómeros de Abeta en un ensayo *in vitro*. Las neuronas embrionales corticales de ratón del día 16.5-17.5 se aislaron, se disociaron y se cultivaron *in vitro* en medio N3-F12. Se permitió que las células crecieran durante nueve días en total, y se alimentaron en el día 3 y en el día en el que se adicionó el oligómero de Abeta, u oligómero de Abeta más anticuerpo hC2 anti-Abeta. En el día cinco (“4 días Abeta”) o día seis (“3 días Abeta”), se trataron ciertos pozos de células con ya sea solo oligómero de Abeta 2 μM o una combinación de oligómero de Abeta 2μM y anticuerpo hC2 anti-Abeta 50 μg/mL.

El oligómero de Abeta se preparó disolviendo Abeta 1-42 (rPéptido) en HFIP, a partir de lo cual se tomaron alícuotas de 10 μL de péptido Abeta a una concentración de 1 mg/mL y posteriormente se evaporaron en una cabina de extracción durante 30 minutos y las películas de los péptidos se almacenaron a -80°C hasta antes de su uso. Al momento de usar, se disolvió la película de péptido en 10 μL de DMSO, posteriormente 78.6 μL de HAMS F12, y se incubó la solución de péptido Abeta a 4°C durante 24-48 horas (concentración final de Abeta 25μM).

Para las células de control se adicionó DMSO-F12 solo en el mismo volumen que Abeta-DMSO en el día 5, y se cultivaron las células durante 4 días adicionales sin ningún tratamiento adicional. En el día 9, las neuronas de todas las condiciones de cultivo se fijaron y se realizó una tinción con Tuj1 (un anticuerpo anti-beta-tubulina), seguida de la tinción con anticuerpos secundarios marcados con FITC para visualizar los microtúbulos, y por consiguiente los procesos neuronales en general. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Las neuronas embrionales corticales de ratón mostraron una morfología normal después de nueve días de cultivo (Figura 13, el panel que se encuentra más a la izquierda). El tratamiento de las células con oligómero de Abeta durante tres días indujo la degeneración de axones y causó una disminución en el número total de axones (Figura 13, panel central de más abajo), y este efecto era aún más pronunciado a los cuatro días del tratamiento (Figura 13, panel central de más arriba). En contraste, las células tratadas con la combinación de oligómero de Abeta y anticuerpo hC2 anti-Abeta se veían similares a las células control (Figura 13, paneles derecho de más arriba y más abajo). Estos resultados indican que el anticuerpo hC2 anti-Abeta era capaz de proteger las neuronas embrionales cortical de ratón de la degeneración inducida por oligómero Abeta.

Tabla 6: Posiciones y cambios realizados en las regiones marco de C2 humanizado de cadena liviana.

Posición en la cadena liviana	45	87	50	53
Ratón $C2V_K$	K	F	K	N
$C2HuV_K1$ humanizado	Q	Y	K	N
$C2HuV_K2$ humanizado	Q	F	K	N
$C2HuV_K3$ humanizado	K	Y	K	N
$C2HuV_K4$ humanizado	K	F	K	N
Línea germinal humana dpK15	Q	Y	L	N
$C2V_K$-R de ratón			R	
$C2V_K$-S de ratón				S

Tabla 7: Posiciones y cambios realizados en las regiones marco de C2 humanizado de cadena pesada

Posición de la cadena pesada	47	94
C2VHAF de ratón	L	S
C2HuVHAF1 humanizado	W	R

C2HuVHAF2 humanizado	W	S
C2HuVHAF3 humanizado	L	R
C2HuVHAF4 humanizado	L	S
DP-54 de línea germinal humana	W	R

Se construyeron un total de 8 anticuerpos diferentes con las cadenas livianas C2HuV$_K$1, C2HuV$_K$2, C2HuV$_K$3, C2HuV$_K$4 humanizados y las cadenas pesadas C2HuVHAF4 y C2HuVHAF2.

Tabla 8. Resumen de péptidos usados en la segunda genoteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrilla.

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	**A**	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	**A**	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	**A**	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	**A**	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	**A**	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	**A**	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	**A**	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	**A**	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	**A**
aa no.	12	13	***14***	***15***	***16***	***17***	***18***	***19***	***20***

Tabla 9. Resumen de péptidos usados en la tercera genoteca.

Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrilla.

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A	
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	**G**	
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	**A**
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	**A**

aa no. 13 ***14*** *15* ***16*** ***17*** *18* ***19*** ***20*** 21 22 *23*

Lista de Referencias

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer – a homogeneus and stable neuropathological protein in alzehimer's disease. J Neurochem 95:834-847.

Blond y Goldberg, 1987, PNAS primero de Marzo, 1987 Vol. 84| No. 5| 1147-1151

Cox JPL, Tomlinson IM y Winter G. Eur. J. Immunol. 1994; **24**: 827-836. A directory of human germ-line Vk segments reveals a strong bias in their usage.

Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. Cloned human and Mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. Cell. 1980 Nov; 22 (1 Pt 1): 197-207.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C.Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Healt and Human Services, 1991.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzehimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs)as a new vaccine and drug targets. Neurochem Int 41(5): 345-352.

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. y Tedder TF. Inmunogenetics 2000; **51**: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences Turing recent evolution.

Mulligan RC and Berg P. Science 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.

Riechman L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature 1988; **332**; 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KF, Thiebe R, Bensch A, Bresing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I y Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; **29**; 2082-2086. Characteristics

of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphons in the Mouse genome.

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB y Winter G. J. Mol. Biol. 1992; **227**: 776-798. The repertoire of human germline V_H sequences reveals about 50 groups of V_H segments with different hypervariable loops.

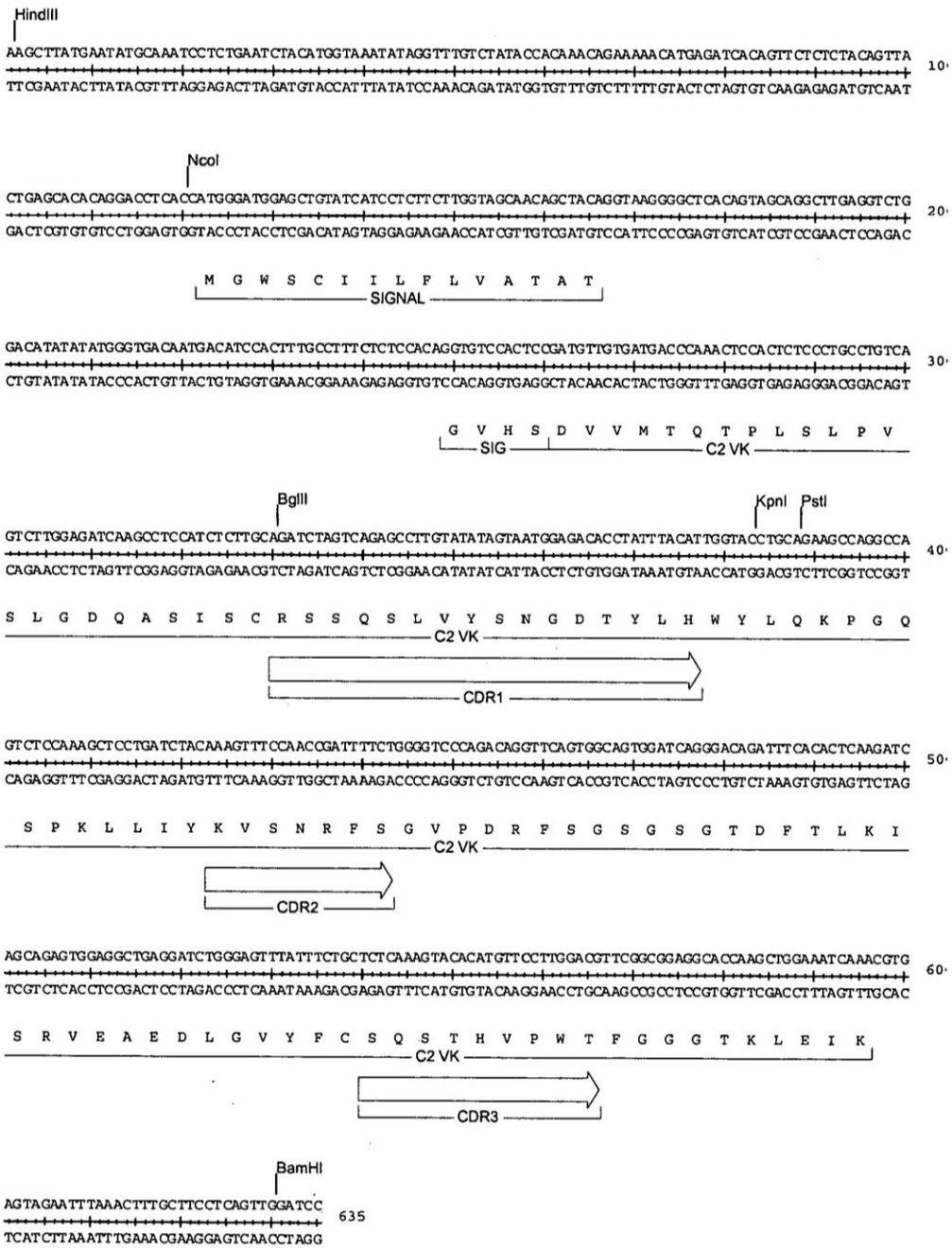


FIG 1

(Ejemplo 2)

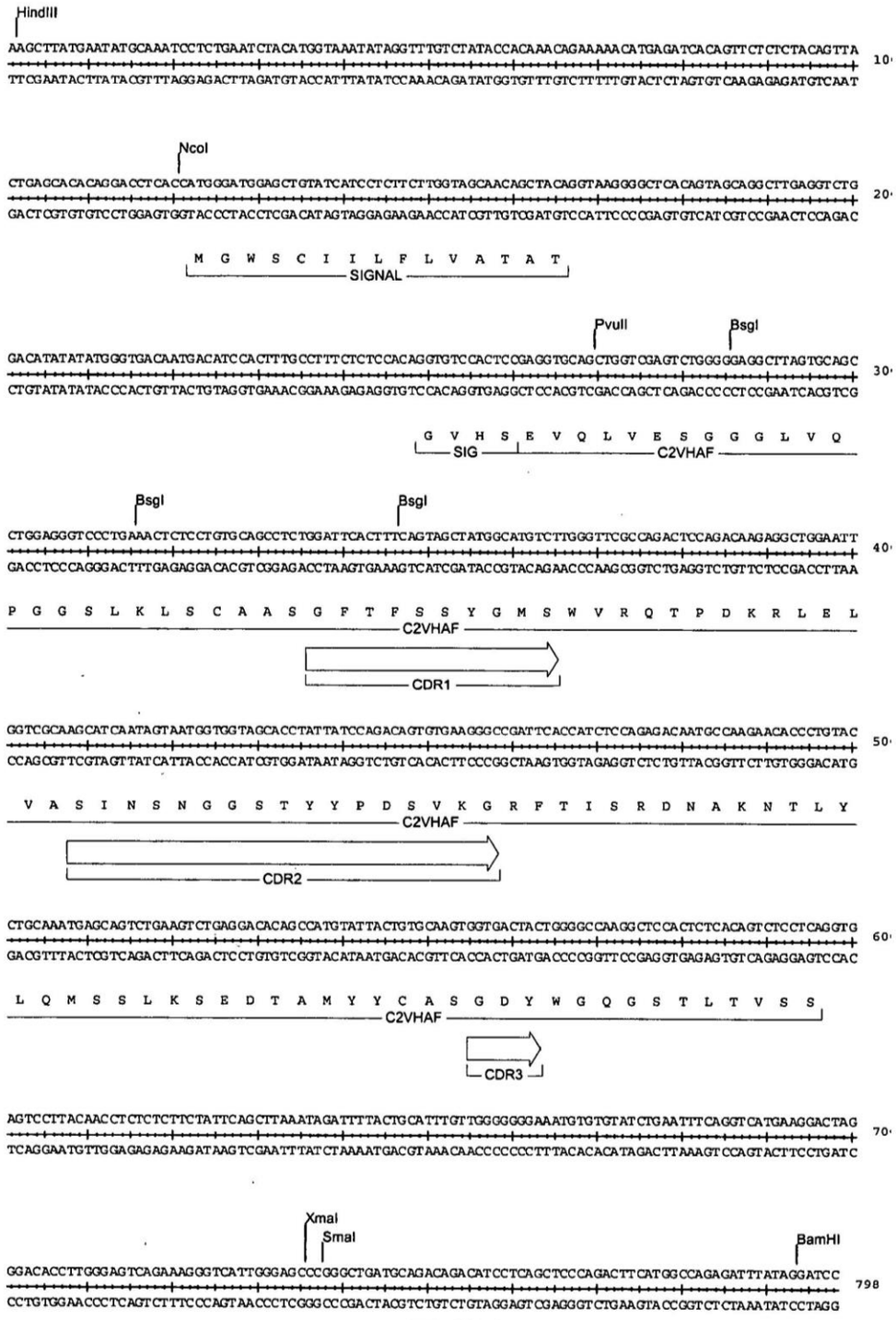


FIG 2

(Ejemplo 2)

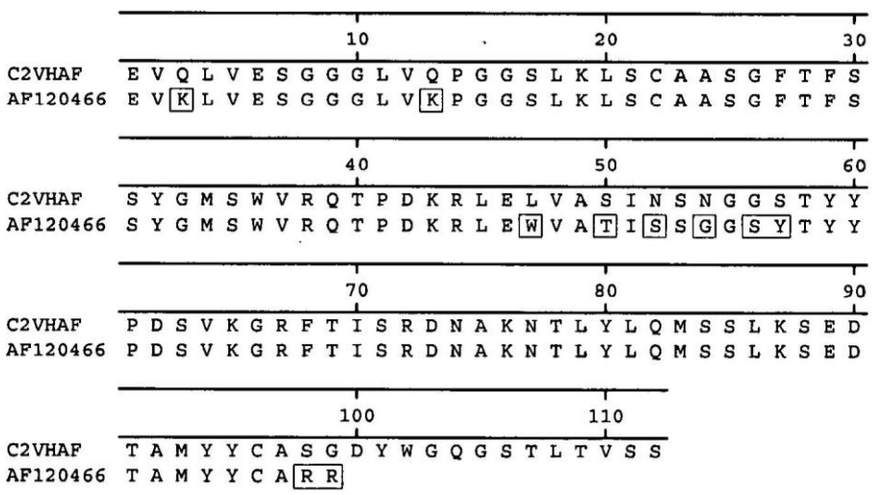


FIG 3

(Ejemplo 5.2)

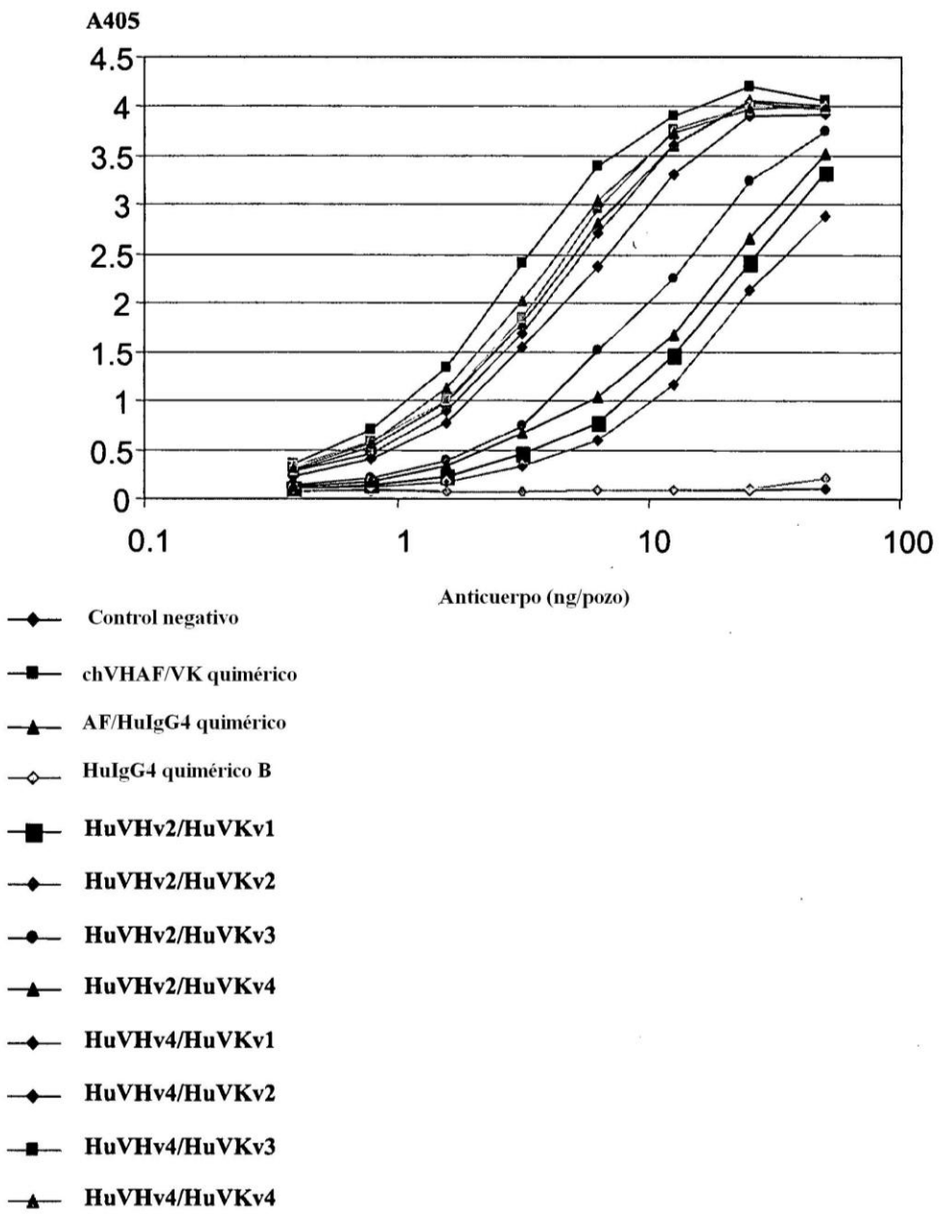


FIG 4
(Ejemplo 8)

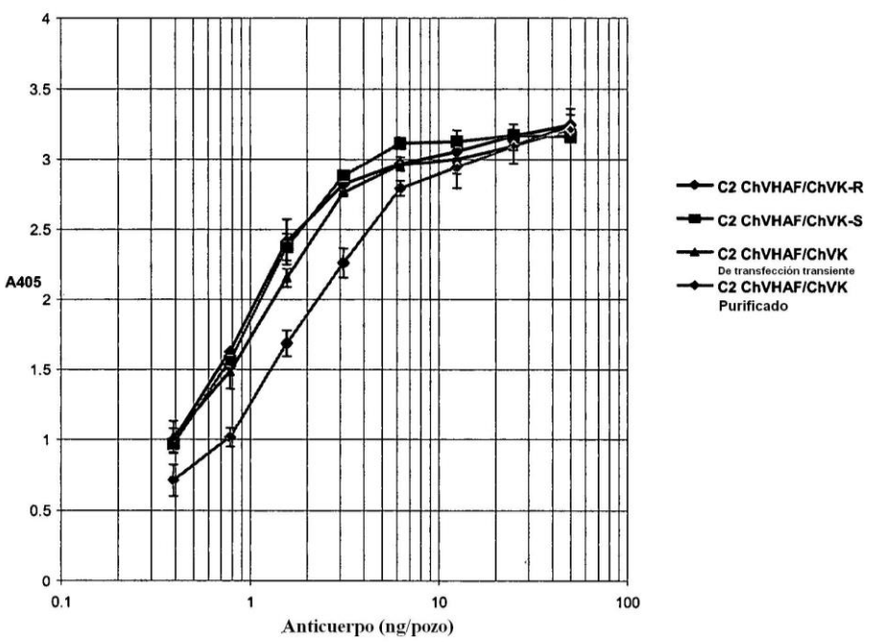


FIG 5
(Ejemplo 9)

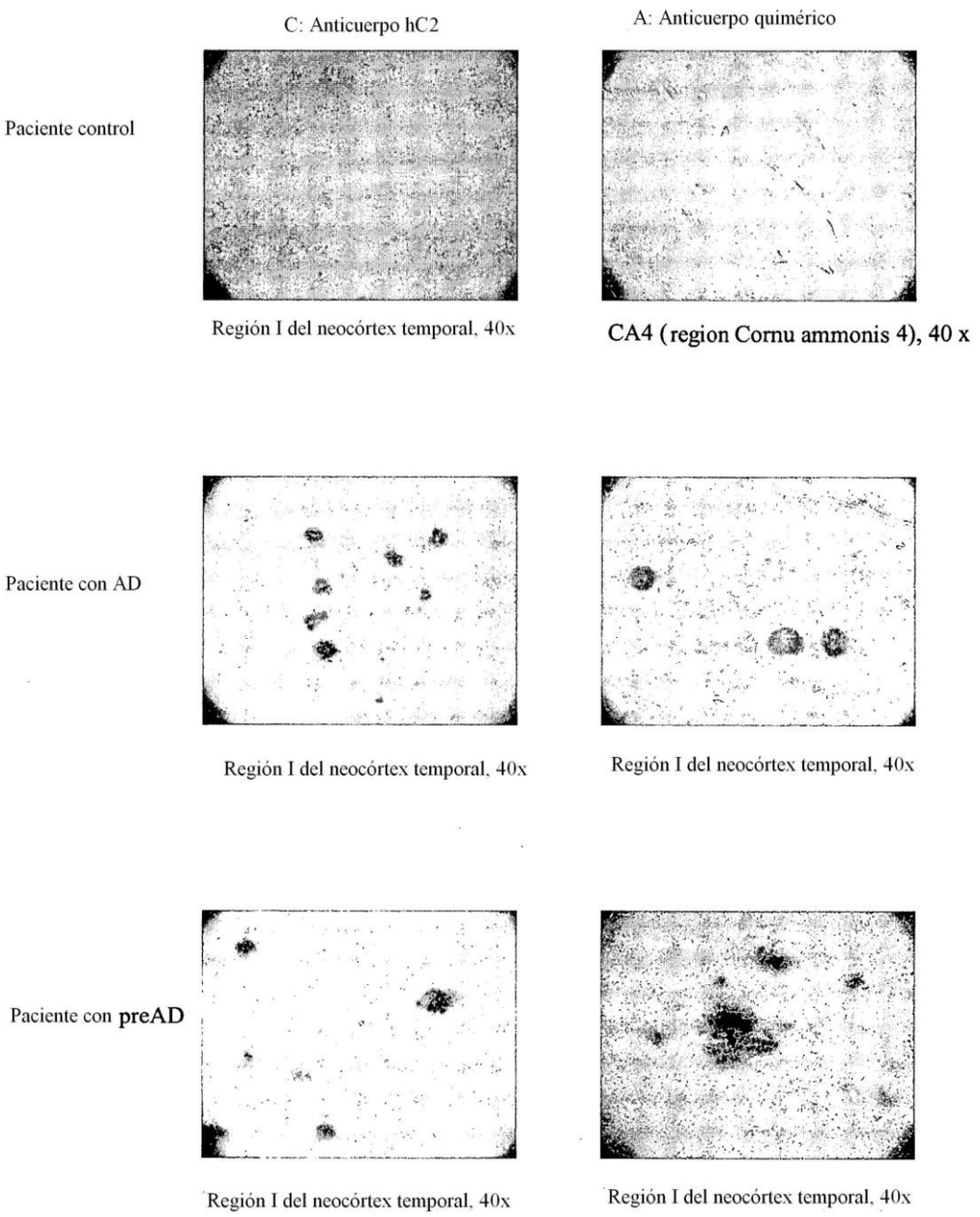
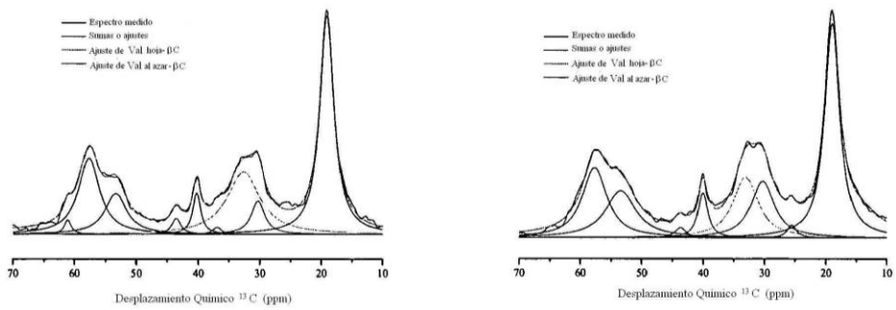


FIG 6 (Ejemplo 11)

A)



B)

Resonancia	PBS			C2 de ratón		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Intensidad Integral	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% Intensidad Integral
Val Cβ -hoja	32.60	479	81.7	33.09	366	53.5
Val Cβ -al azar	30.27	200	18.3	30.27	340	46.5

A)La comparación del espectro de CPMAS ^{13}C y los ajustes para U-^{13}C Tyr 10 y Val 12 marcaron fibras amiloides β1-42 incubadas con PBS (izquierda, como control), o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 hrs y luego se liofilizó. Los ajustes para las dos conformaciones de Val12 Cβ se muestran en verde (hoja) y azul (enrollamiento al azar). El pico a c33 ppm corresponde a la conformación de hoja beta de las fibras mientras que a 30ppm es un resultado de la conformación de enrollamiento al azar.

B)Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de Val12 Cβ . Los desplazamientos químicos ajustados son muy similares pero las intensidades integrales son muy diferentes, reflejando una reducción en la conformación original de hoja beta por aprox. 35% (1-(53.5/81.7)). Esto corresponde muy bien con el valor obtenido de la medida de fluorescencia

FIG. 7

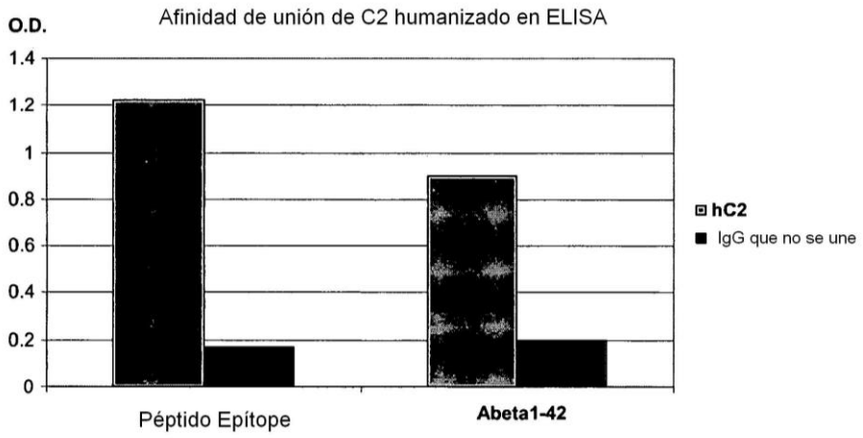


FIG 8
(Ejemplo 12)

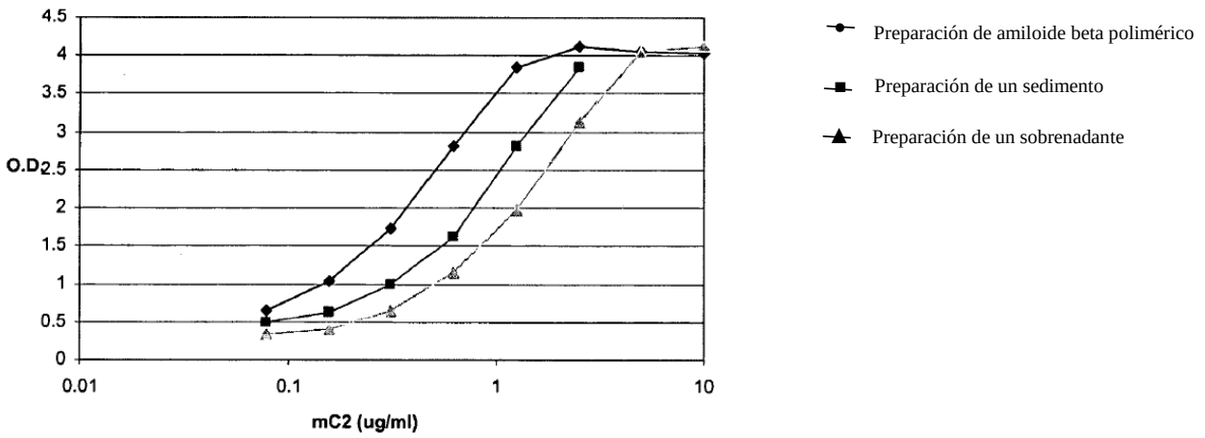


FIG 9

(Ejemplo 14)

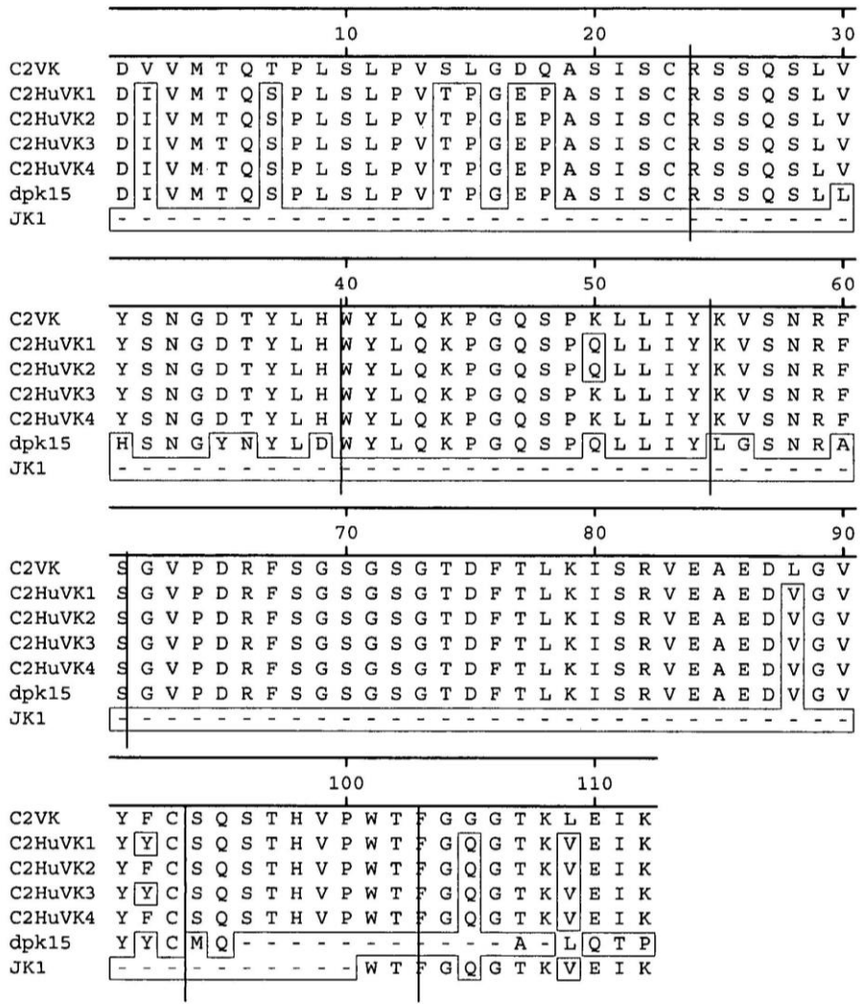

10 20 30
C2VK D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK1 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK2 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK3 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
C2HuVK4 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V
dpk15 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L
JK1 -
40 50 60
C2VK Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
C2HuVK1 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F
C2HuVK2 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F
C2HuVK3 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
C2HuVK4 Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F
dpk15 H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A
JK1 -
70 80 90
C2VK S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V
C2HuVK1 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK2 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK3 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
C2HuVK4 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
dpk15 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V
JK1 -
100 110
C2VK Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K
C2HuVK1 Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK2 Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK3 Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2HuVK4 Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
dpk15 Y Y C M Q - - - - - - - - - - A - L Q T P
JK1 - - - - - - - - - - W T F G Q G T K V E I K

FIG 10.

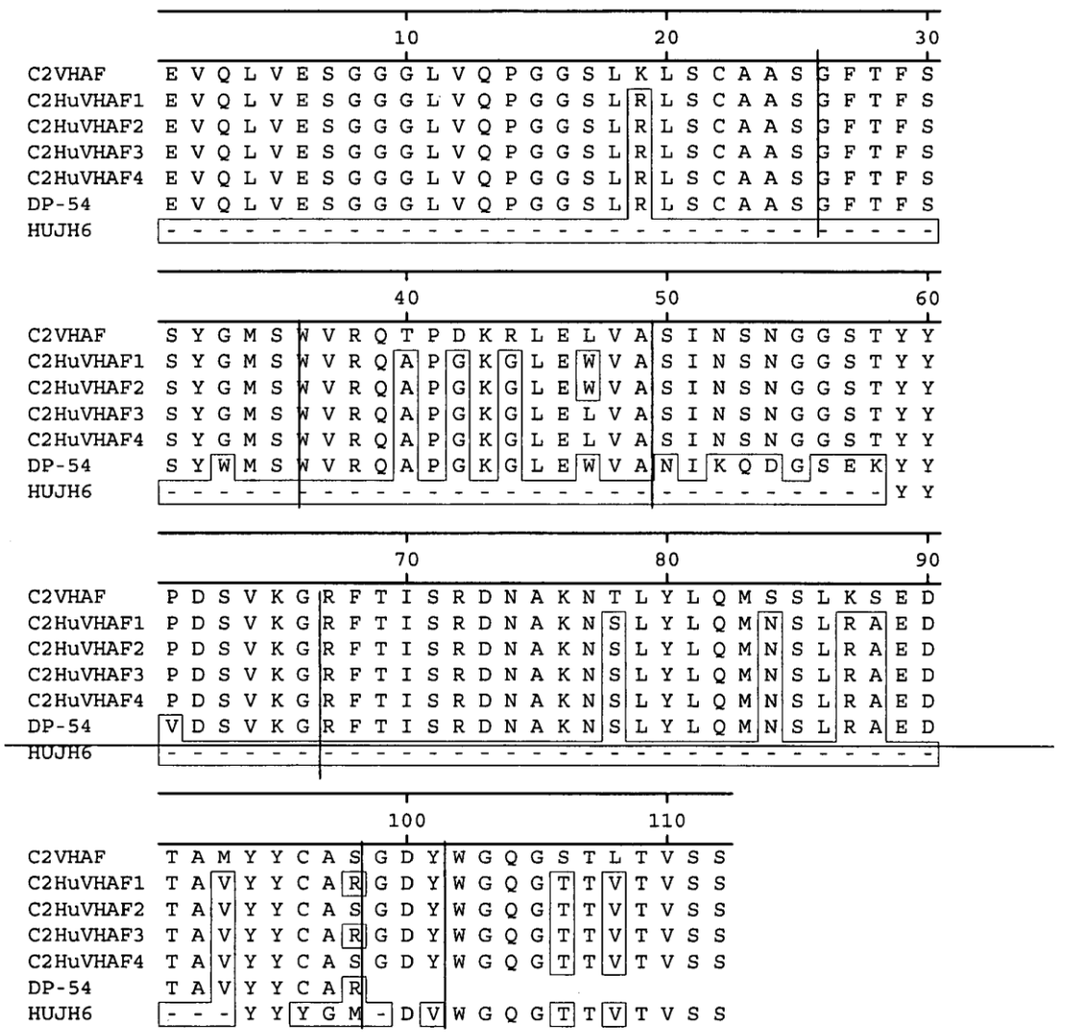

10 20 30
C2VHAF E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF2 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF3 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
C2HuVHAF4 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
DP-54 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
HUJH6 -
40 50 60
C2VHAF S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y
C2HuVHAF1 S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y
C2HuVHAF2 S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y
C2HuVHAF3 S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y
C2HuVHAF4 S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y
DP-54 S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y
HUJH6 - Y Y
70 80 90
C2VHAF P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D
C2HuVHAF1 P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
C2HuVHAF2 P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
C2HuVHAF3 P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
C2HuVHAF4 P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
DP-54 V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
HUJH6 -
100 110
C2VHAF T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S
C2HuVHAF1 T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S
C2HuVHAF2 T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S
C2HuVHAF3 T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S
C2HuVHAF4 T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S
DP-54 T A V Y Y C A R
HUJH6 - - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S

FIG 11.

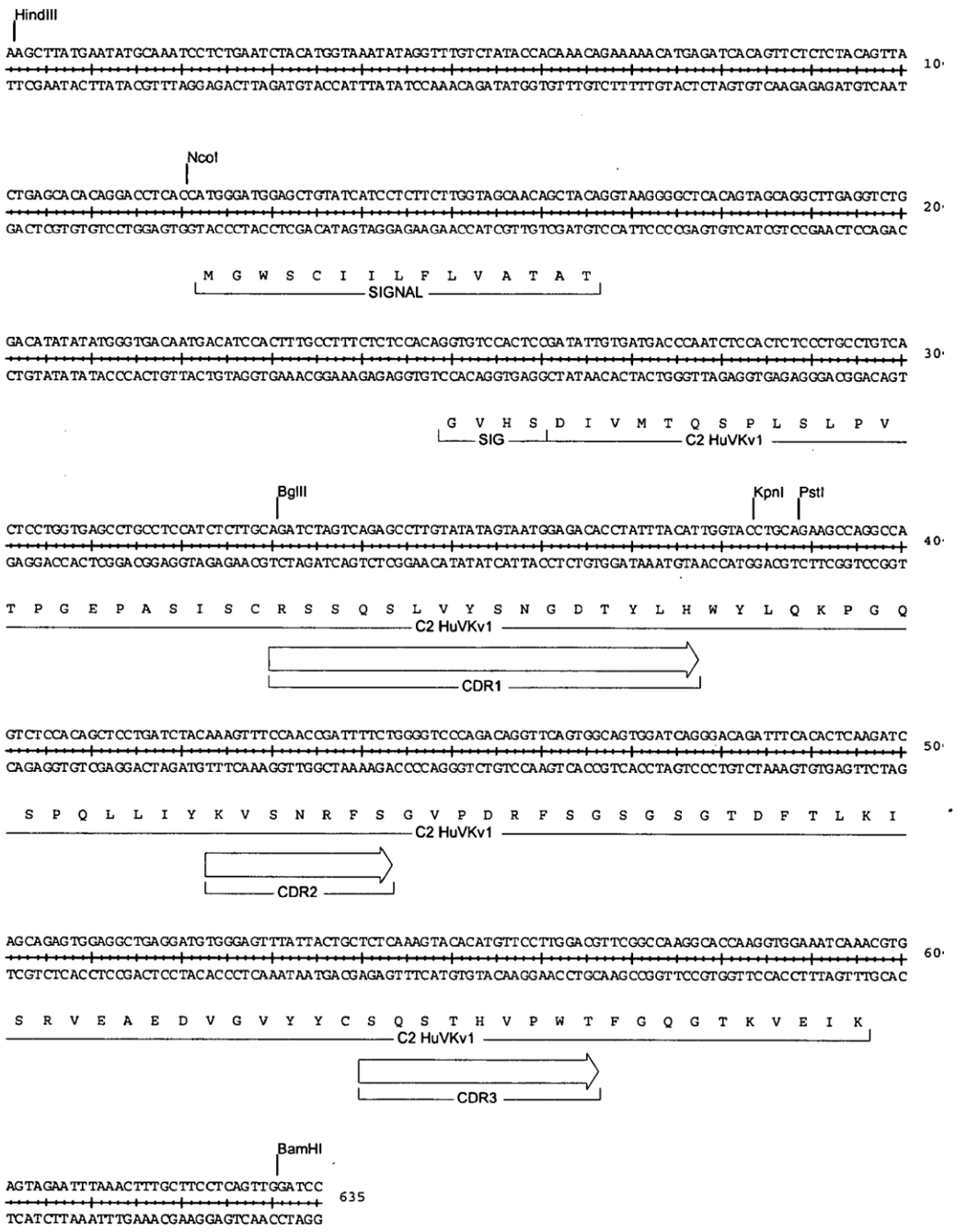

HindIII
AAGCTTATGAATATGCAAATCCTCTGAATCTACATGGTAAATATAGGTTTGTCTATACCACAAACAGAAAAACATGAGATCACAGTTCTCTCTACAGTTA
TTCGAATACTTATACGTTTAGGAGACTTAGATGTACCATTTATATCCAAACAGATATGGTGTTTGTCTTTTTGTACTCTAGTGTCAAGAGAGATGTCAAT
10
NcoI
CTGAGCACACAGGACCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTAAGGGCTCACAGTAGCAGGCTTGAGGTCTG
GACTCGTGTGTCCTGGAGTGGTACCCTACCTCGACATAGTAGGAGAAGAACCATCGTTGTCGATGTCCATTCCCCGAGTGTCATCGTCCGAACTCCAGAC
20
M G W S C I I L F L V A T A T
SIGNAL
GACATATATATGGGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCGATATTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCA
CTGTATATATACCCACTGTTACTGTAGGTGAAACGGAAAGAGAGGTGTCCACAGGTGAGGCTATAACACTACTGGGTTAGAGGTGAGAGGGACGGACAGT
30
G V H S D I V M T Q S P L S L P V
SIG
C2 HuVKv1
BglII
KpnI
PstI
CTCCTGGTGAGCCTGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAGACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCA
GAGGACCACTCGGACGGAGGTAGAGAACGTCTAGATCAGTCTCGGAACATATATCATTACCTCTGTGGATAAATGTAACCATGGACGTCTTCGGTCCGGT
40
T P G E P A S I S C R S S Q S L V Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q
C2 HuVKv1
CDR1
GTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATC
CAGAGGTGTCGAGGACTAGATGTTTCAAAGGTTGGCTAAAAGACCCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAG
50
S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
C2 HuVKv1
CDR2
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCTTGGACGTTCGGCCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGTG
TCGTCTCACCTCCGACTCCTACACCCTCAAATAATGACGAGAGTTTCATGTGTACAAGGAACCTGCAAGCCGGTTCCGTGGTTCCACCTTTAGTTTGCAC
60
S R V E A E D V G V Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K
C2 HuVKv1
CDR3
BamHI
AGTAGAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCC
TCATCTTAAATTTGAAACGAAGGAGTCAACCTAGG
635

FIG 12

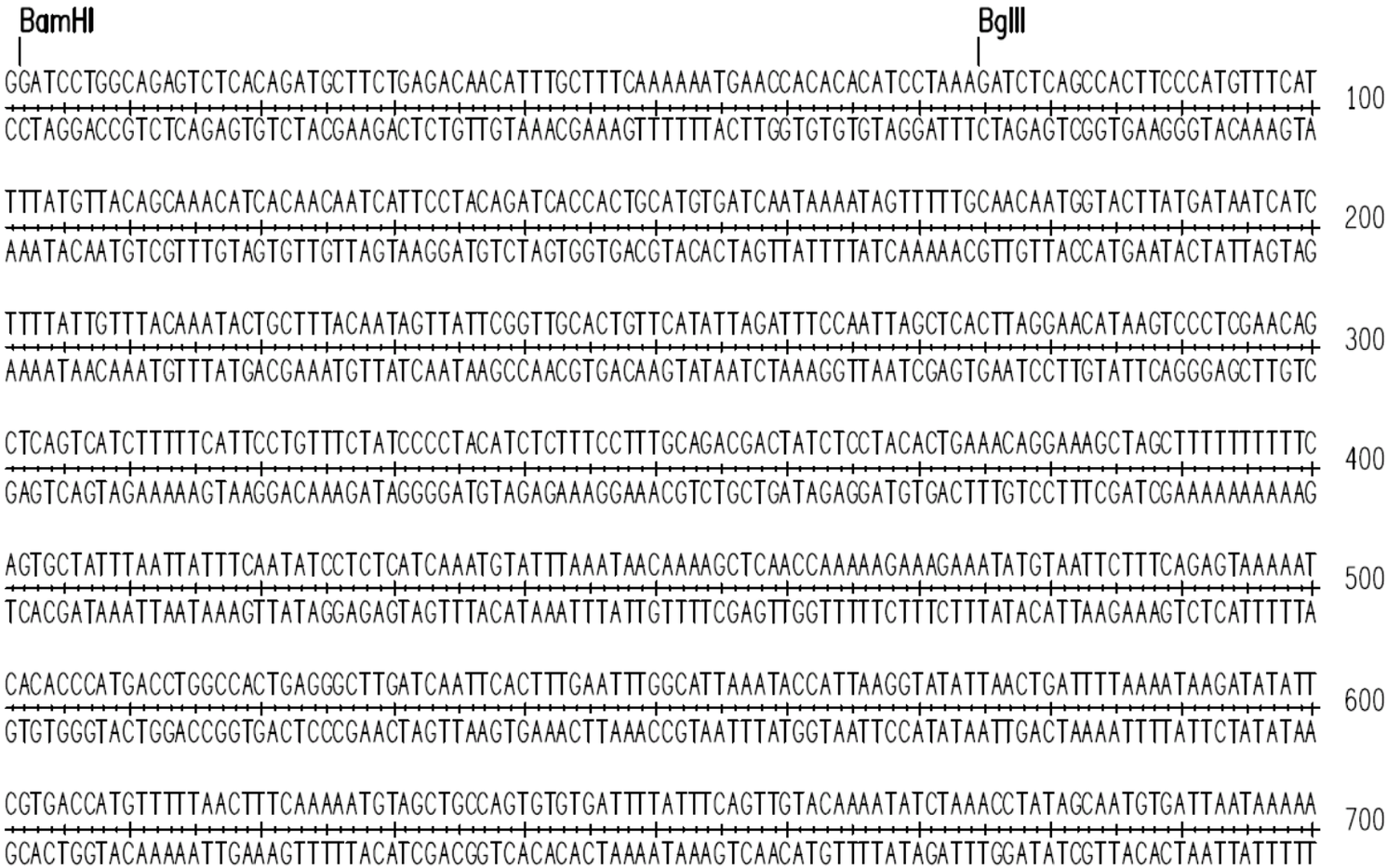

BamHI
BglII
GGATCCTGGCAGAGTCTCACAGATGCTTCTGAGACAACATTTGCTTTCAAAAAATGAACCACACACATCCTAAAGATCTCAGCCACTTCCCATGTTTCAT
CCTAGGACCGTCTCAGAGTGTCTACGAAGACTCTGTTGTAAACGAAAGTTTTTTTACTTGGTGTGTGTAGGATTTCTAGAGTCGGTGAAGGGTACAAAGTA
100
TTTATGTTACAGCAAACATCACAACAATCATTCCTACAGATCACCACTGCATGTGATCAATAAAATAGTTTTTGCAACAATGGTACTTATGATAATCATC
AAATACAATGTCGTTTGTAGTGTTGTTAGTAAGGATGTCTAGTGGTGACGTACACTAGTTATTTTATCAAAAACGTTGTTACCATGAATACTATTAGTAG
200
TTTTATTGTTTACAAATACTGCTTTACAATAGTTATTCGGTTGCACTGTTCATATTAGATTTCCAATTAGCTCACTTAGGAACATAAGTCCCTCGAACAG
AAAATAACAAATGTTTATGACGAAATGTTATCAATAAGCCAACGTGACAAGTATAATCTAAAGGTTAATCGAGTGAATCCTTGTATTCAGGGAGCTTGTC
300
CTCAGTCATCTTTTTCATTCCTGTTTCTATCCCCTACATCTCTTTCCTTTGCAGACGACTATCTCCTACACTGAAACAGGAAAGCTAGCTTTTTTTTTTC
GAGTCAGTAGAAAAAGTAAGGACAAAGATAGGGGATGTAGAGAAAGGAAACGTCTGCTGATAGAGGATGTGACTTTGTCCTTTCGATCGAAAAAAAAAAG
400
AGTGCTATTTAATTATTTCAATATCCTCTCATCAAATGTATTTAAATAACAAAAGCTCAACCAAAAAGAAAGAAATATGTAATTCTTTCAGAGTAAAAAT
TCACGATAAATTAATAAAGTTATAGGAGAGTAGTTTACATAAATTTATTGTTTTCGAGTTGGTTTTTCTTTCTTTATACATTAAGAAAGTCTCATTTTTA
500
CACACCCATGACCTGGCCACTGAGGGCTTGATCAATTCACTTTGAATTTGGCATTAAATACCATTAAGGTATATTAACTGATTTTAAAATAAGATATATT
GTGTGGGTACTGGACCGGTGACTCCCGAACTAGTTAAGTGAAACTTAAACCGTAATTTATGGTAATTCCATATAATTGACTAAAATTTTATTCTATATAA
600
CGTGACCATGTTTTTAACTTTCAAAAATGTAGCTGCCAGTGTGTGATTTTATTTCAGTTGTACAAAATATCTAAACCTATAGCAATGTGATTAATAAAAA
GCACTGGTACAAAAATTGAAAGTTTTTACATCGACGGTCACACACTAAAATAAAGTCAACATGTTTTATAGATTTGGATATCGTTACACTAATTATTTTT
700

FIG. 13-1

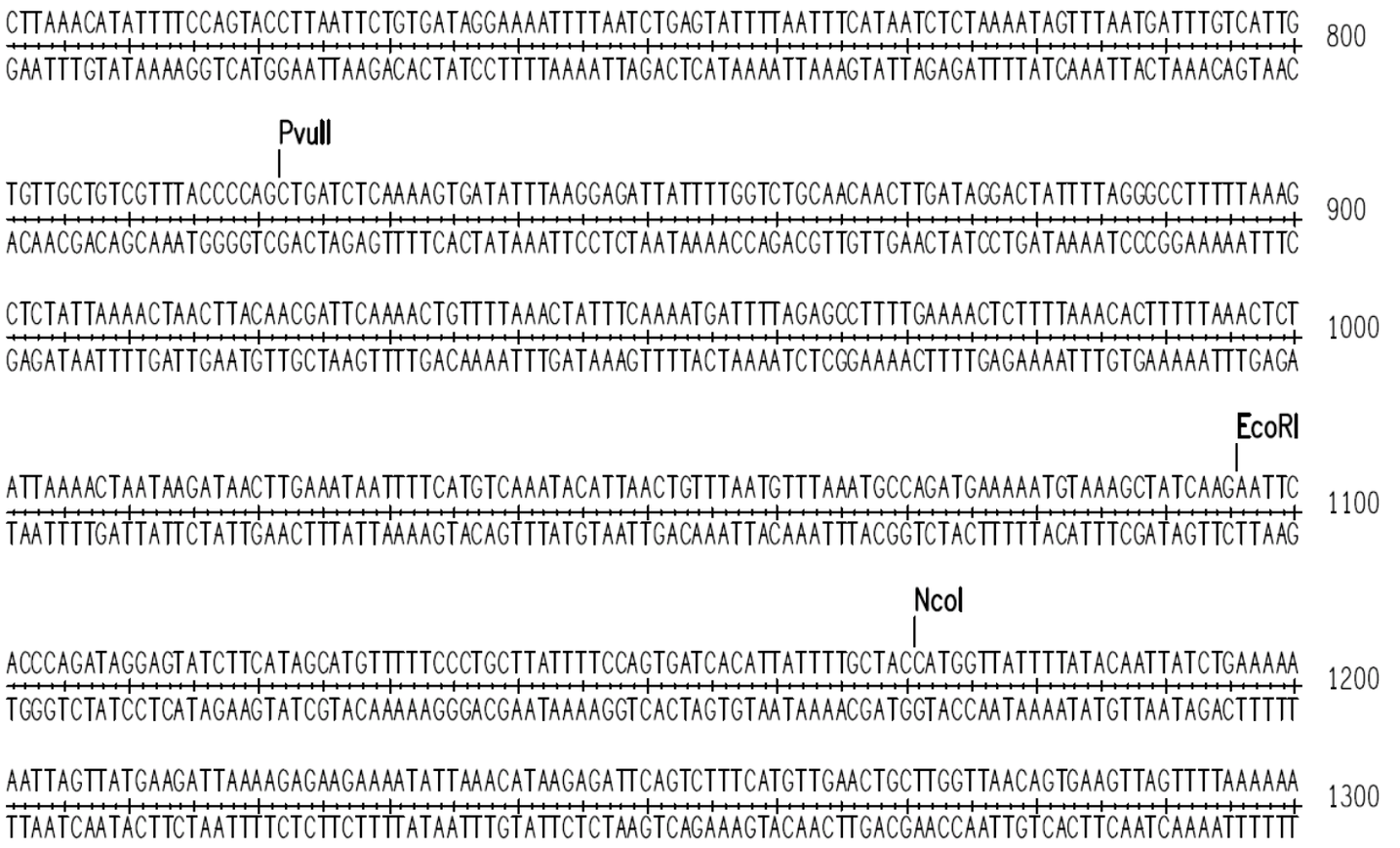

CTTAAACATATTTTCCAGTACCTTAATTCTGTGATAGGAAAATTTTAATCTGAGTATTTTAATTTCATAATCTCTAAAATAGTTTAATGATTTGTCATTG
GAATTTGTATAAAAGGTCATGGAATTAAGACACTATCCTTTTAAAATTAGACTCATAAAATTAAAGTATTAGAGATTTTATCAAATTACTAAACAGTAAC
800
PvuII
TGTTGCTGTCGTTTACCCCAGCTGATCTCAAAAGTGATATTTAAGGAGATTATTTTGGTCTGCAACAACTTGATAGGACTATTTTAGGGCCTTTTTAAAG
ACAACGACAGCAAATGGGGTCGACTAGAGTTTTCACTATAAATTCCTCTAATAAAACCAGACGTTGTTGAACTATCCTGATAAAATCCCGGAAAAATTTC
900
CTCTATTAAAACTAACTTACAACGATTCAAAACTGTTTTAAACTATTTCAAAATGATTTTAGAGCCTTTTGAAAACTCTTTTAAACACTTTTTAAACTCT
GAGATAATTTTGATTGAATGTTGCTAAGTTTTGACAAAATTTGATAAAGTTTTACTAAAATCTCGGAAAACTTTTGAGAAAATTTGTGAAAAATTTGAGA
1000
EcoRI
ATTAAAACTAATAAGATAACTTGAAATAATTTTCATGTCAAATACATTAACTGTTTAATGTTTAAATGCCAGATGAAAAATGTAAAGCTATCAAGAATTC
TAATTTTGATTATTCTATTGAACTTTATTAAAAGTACAGTTTATGTAATTGACAAATTACAAATTTACGGTCTACTTTTTACATTTCGATAGTTCTTAAG
1100
NcoI
ACCCAGATAGGAGTATCTTCATAGCATGTTTTTCCCTGCTTATTTTCCAGTGATCACATTATTTTGCTACCATGGTTATTTTATACAATTATCTGAAAAA
TGGGTCTATCCTCATAGAAGTATCGTACAAAAAGGGACGAATAAAAGGTCACTAGTGTAATAAAACGATGGTACCAATAAAATATGTTAATAGACTTTTT
1200
AATTAGTTATGAAGATTAAAAGAGAAGAAAATATTAAACATAAGAGATTCAGTCTTTCATGTTGAACTGCTTGGTTAACAGTGAAGTTAGTTTTAAAAAA
TTAATCAATACTTCTAATTTTCTCTTCTTTTATAATTTGTATTCTCTAAGTCAGAAAGTACAACTTGACGAACCAATTGTCACTTCAATCAAAATTTTTT
1300

FIG. 13-2

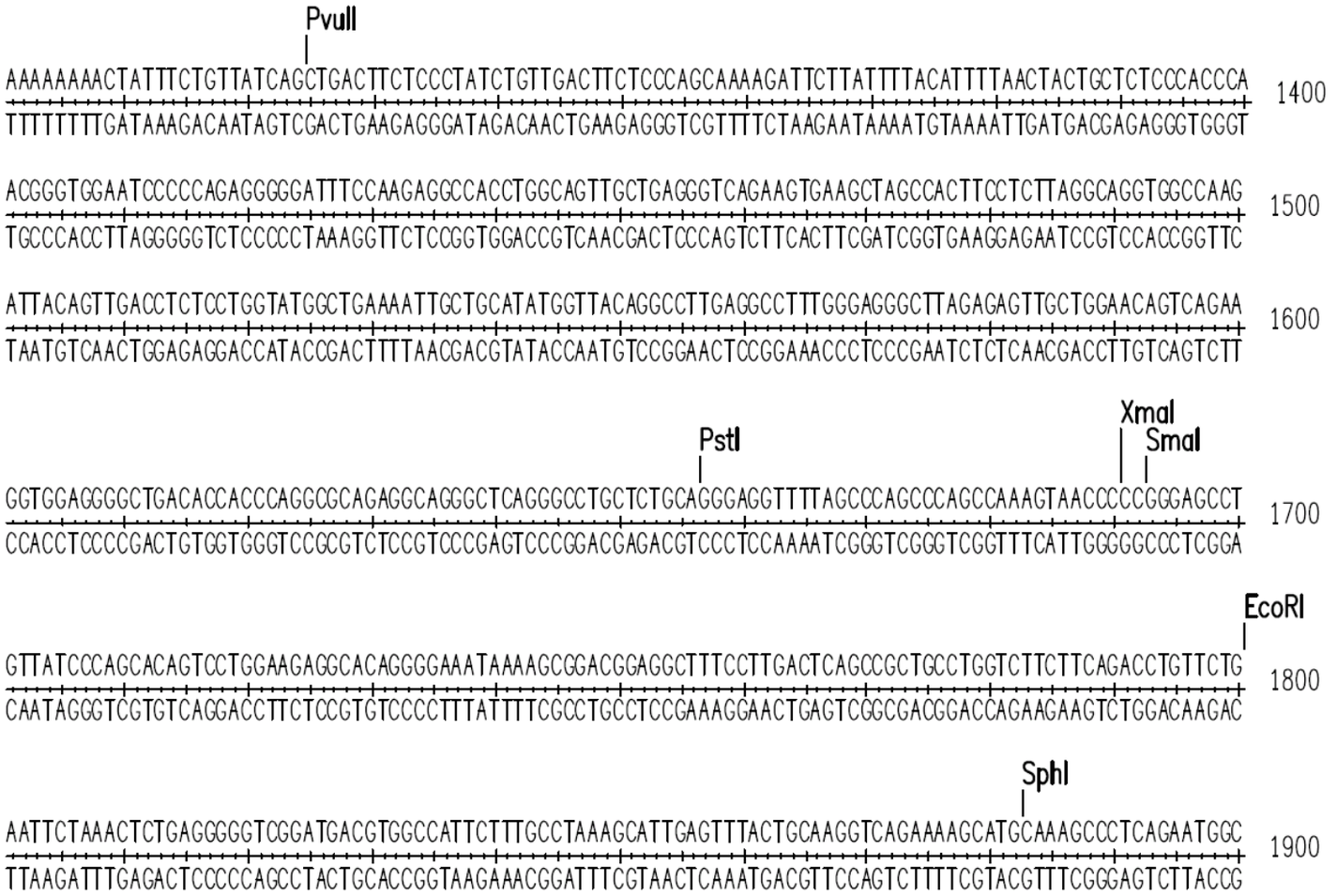

PvuII
AAAAAAAACTATTTCTGTTATCAGCTGACTTCTCCCTATCTGTTGACTTCTCCCAGCAAAAGATTCTTATTTTACATTTTAACTACTGCTCTCCCACCCA
TTTTTTTTGATAAAGACAATAGTCGACTGAAGAGGGATAGACAACTGAAGAGGGTCGTTTTCTAAGAATAAAATGTAAAATTGATGACGAGAGGGTGGGT
1400
ACGGGTGGAATCCCCCAGAGGGGGATTTCCAAGAGGCCACCTGGCAGTTGCTGAGGGTCAGAAGTGAAGCTAGCCACTTCCTCTTAGGCAGGTGGCCAAG
TGCCCACCTTAGGGGGTCTCCCCCTAAAGGTTCTCCGGTGGACCGTCAACGACTCCCAGTCTTCACTTCGATCGGTGAAGGAGAATCCGTCCACCGGTTC
1500
ATTACAGTTGACCTCTCCTGGTATGGCTGAAAATTGCTGCATATGGTTACAGGCCTTGAGGCCTTTGGGAGGGCTTAGAGAGTTGCTGGAACAGTCAGAA
TAATGTCAACTGGAGAGGACCATACCGACTTTTAACGACGTATACCAATGTCCGGAACTCCGGAAACCCTCCCGAATCTCTCAACGACCTTGTCAGTCTT
1600
XmaI
PstI
SmaI
GGTGGAGGGGCTGACACCACCCAGGCGCAGAGGCAGGGCTCAGGGCCTGCTCTGCAGGGAGGTTTTAGCCCAGCCCAGCCAAAGTAACCCCCGGGAGCCT
CCACCTCCCCGACTGTGGTGGGTCCGCGTCTCCGTCCCGAGTCCCGGACGAGACGTCCCTCCAAAATCGGGTCGGGTCGGTTTCATTGGGGGCCCTCGGA
1700
EcoRI
GTTATCCCAGCACAGTCCTGGAAGAGGCACAGGGGAAATAAAAGCGGACGGAGGCTTTCCTTGACTCAGCCGCTGCCTGGTCTTCTTCAGACCTGTTCTG
CAATAGGGTCGTGTCAGGACCTTCTCCGTGTCCCCTTTATTTTCGCCTGCCTCCGAAAGGAACTGAGTCGGCGACGGACCAGAAGAAGTCTGGACAAGAC
1800
SphI
AATTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGC
TTAAGATTTGAGACTCCCCCAGCCTACTGCACCGGTAAGAAACGGATTTCGTAACTCAAATGACGTTCCAGTCTTTTCGTACGTTTCGGGAGTCTTACCG
1900

FIG. 13-3

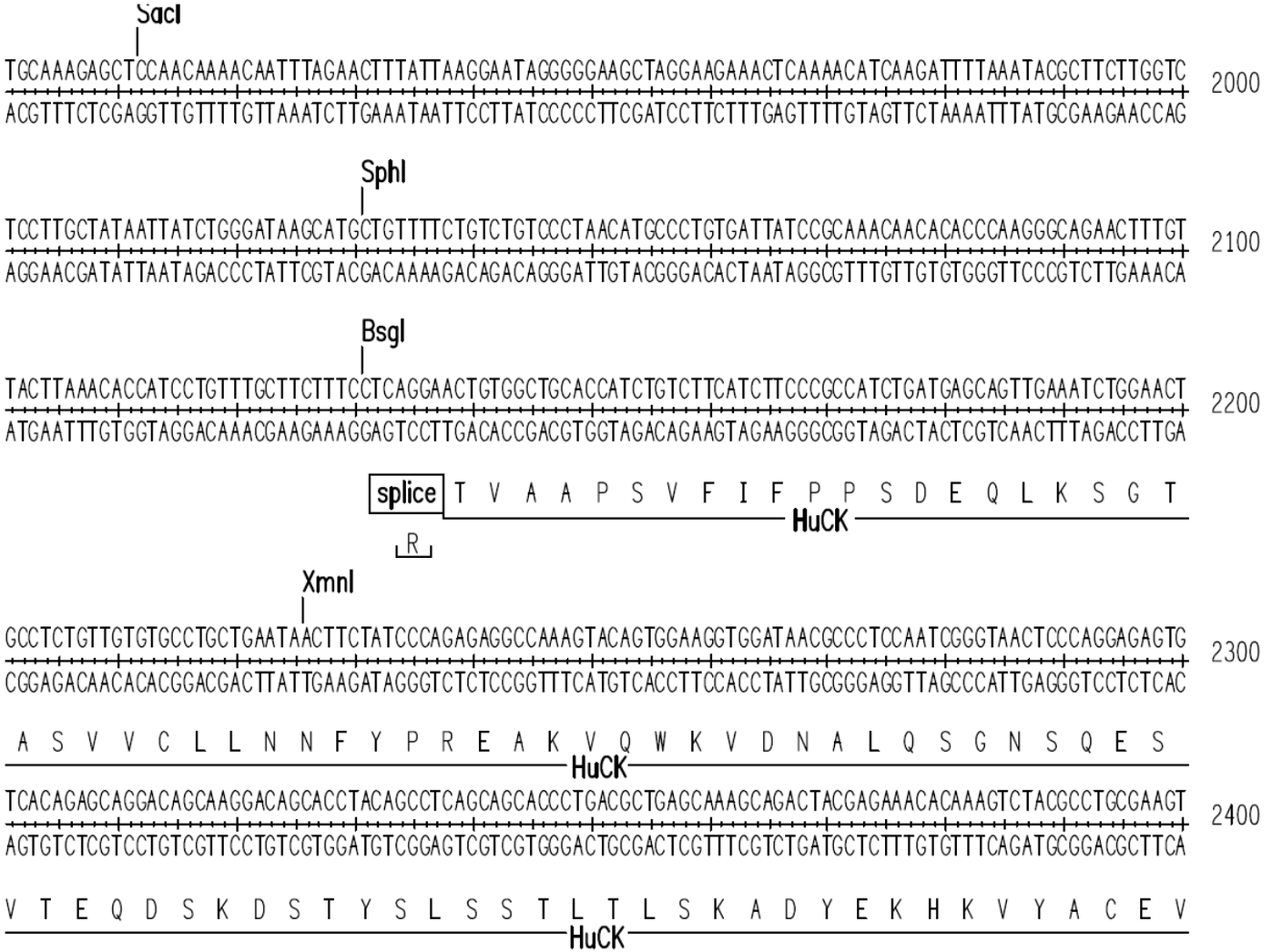

SacI
TGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTC
ACGTTTCTCGAGGTTGTTTTGTTAAATCTTGAAATAATTCCTTATCCCCCTTCGATCCTTCTTTGAGTTTTGTAGTTCTAAAATTTATGCGAAGAACCAG
2000
SphI
TCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGT
AGGAACGATATTAATAGACCCTATTCGTACGACAAAAGACAGACAGGGATTGTACGGGACACTAATAGGCGTTTGTTGTGTGGGTTCCCGTCTTGAAACA
2100
BsgI
TACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT
ATGAATTTGTGGTAGGACAAACGAAGAAAGGAGTCCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTAGAAGGGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACCTTGA
2200
splice
T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T
HuCK
R
XmnI
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
CGGAGACAACACACGGACGACTTATTGAAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACCTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCCATTGAGGGTCCTCTCAC
2300
A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
HuCK
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
AGTGTCTCGTCCTGTCGTTCCTGTCGTGGATGTCGGAGTCGTCGTGGGACTGCGACTCGTTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCA
2400
V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
HuCK

FIG. 13-4

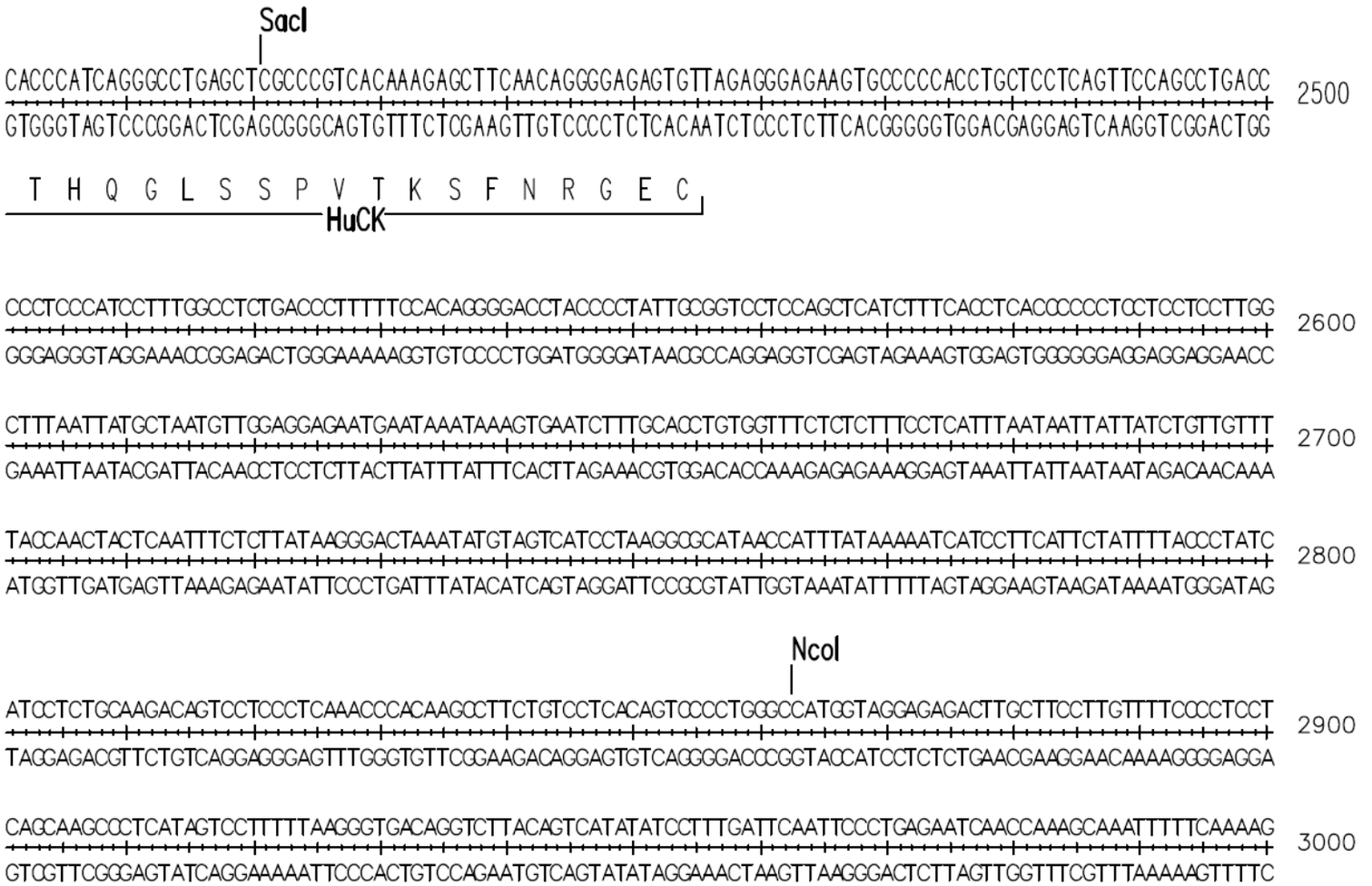

SacI
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTGCCCCCACCTGCTCCTCAGTTCCAGCCTGACC
GTGGGTAGTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTTTCTCGAAGTTGTCCCCTCTCACAATCTCCCTCTTCACGGGGGTGGACGAGGAGTCAAGGTCGGACTGG
2500
T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
HuCK
CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCCTTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTTGG
GGGAGGGTAGGAAACCGGAGACTGGGAAAAAGGTGTCCCCTGGATGGGGATAACGCCAGGAGGTCGAGTAGAAAGTGGAGTGGGGGGAGGAGGAGGAACC
2600
CTTTAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTTCCTCATTTAATAATTATTATCTGTTGTTT
GAAATTAATACGATTACAACCTCCTCTTACTTATTTATTTCACTTAGAAACGTGGACACCAAAGAGAGAAAGGAGTAAATTATTAATAATAGACAACAAA
2700
TACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCTTCATTCTATTTTACCCTATC
ATGGTTGATGAGTTAAAGAGAATATTCCCTGATTTATACATCAGTAGGATTCCGCGTATTGGTAAATATTTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAATGGGATAG
2800
NcoI
ATCCTCTGCAAGACAGTCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTTCTGTCCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCCTTGTTTTCCCCTCCT
TAGGAGACGTTCTGTCAGGAGGGAGTTTGGGTGTTCGGAAGACAGGAGTGTCAGGGGACCCGGTACCATCCTCTCTGAACGAAGGAACAAAAGGGGAGGA
2900
CAGCAAGCCCTCATAGTCCTTTTTAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCATATATCCTTTGATTCAATTCCCTGAGAATCAACCAAAGCAAATTTTTCAAAAG
GTCGTTCGGGAGTATCAGGAAAAATTCCCACTGTCCAGAATGTCAGTATATAGGAAACTAAGTTAAGGGACTCTTAGTTGGTTTCGTTTAAAAAGTTTTC
3000

FIG. 13-5


AAGAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTCATTGCAACATGATATAAAATAACAACACAATAAAAGCAATTAAATAAACAAACAATAGGGAAATGTTTAAGT
TTCTTTGGACGATATTTCTCTTAGTAAGTAACGTTGTACTATATTTTATTGTTGTGTTATTTTCGTTAATTTATTTGTTTGTTATCCCTTTACAAATTCA
3100
TCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAATGTCATGCCTTATTTACATTTTTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTT
AGTAGTACCATGAATCTGAATTACCTTACAGTACGGAATAAATGTAAAAATTTGTCCATGACTCCCTGAGGACAGACGGTTCCCGGCATAACTCATGAAA
3200
CCACAACCTAATTTAATCCACACTATACTGTGAGATTAAAAACATTCATTAAAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTCTATAAC
GGTGTTGGATTAAATTAGGTGTGATATGACACTCTAATTTTTGTAAGTAATTTTACAACGTTTCCAAGATATTTCGACTCTCTGTTTATATAAGATATTG
3300
XbaI
TCAGCAATCCCACTTCTAGATGACTGAGTGTCCCCACCCACCAAAAAACTATGCAAGAATGTTCAAAGCAGCTTTATTTACAAAAGCCAAAAATTGGAAA
AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGGTGGGTGGTTTTTTGATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAAATAAATGTTTTCGGTTTTTAACCTTT
3400
TAGCCCGATTGTCCAACAATAGAATGAGTTATTAAACTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCCAATGAGGAGAATTAACAAGCTACAACTATACCTAC
ATCGGGCTAACAGGTTGTTATCTTACTCAATAATTTGACACCATACAAATATGTAATCTTATGGGTTACTCCTCTTAATTGTTCGATGTTGATATGGATG
3500
TCACACAGATGAATCTCATAAAAATAATGTTACATAAGAGAAACTCAATGCAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTCATCCATATAAAGTTCAAAACCAGGT
AGTGTGTCTACTTAGAGTATTTTTATTACAATGTATTCTCTTTGAGTTACGTTTTCTATACAAGACATACAAAAGTAGGTATATTTCAAGTTTTGGTCCA
3600
AAAAATAAAGTTAGAAATTTGGATGGAAATTACTCTTAGCTGGGGGTGGGCGAGTTAGTGCCTGGGAGAAGACAAGAAGGGGCTTCTGGGGTCTTGGTAA
TTTTTATTTCAATCTTTAAACCTACCTTTAATGAGAATCGACCCCCACCCGCTCAATCACGGACCCTCTTCTGTTCTTCCCCGAAGACCCCAGAACCATT
3700

FIG. 13-6

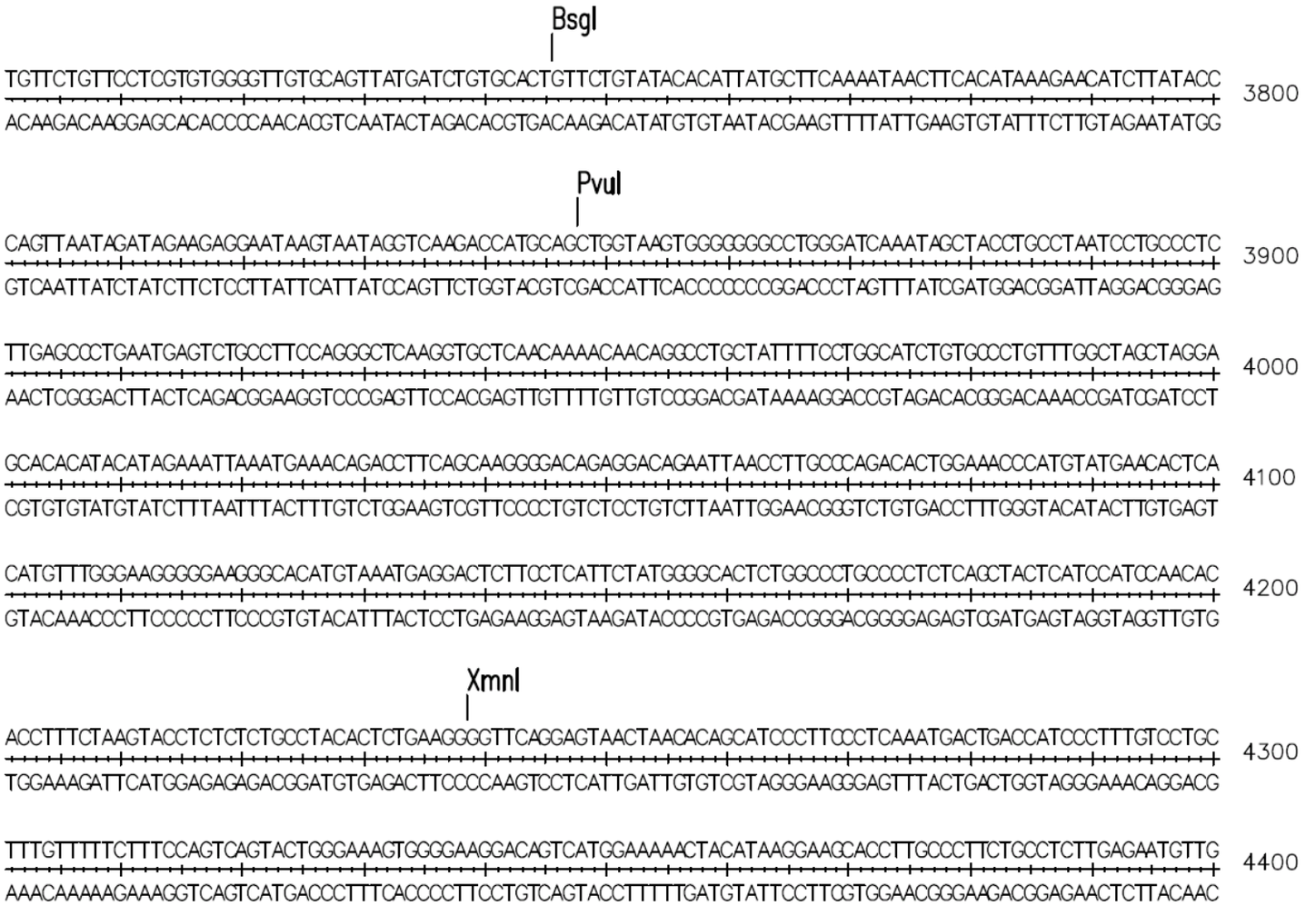

BsgI
TGTTCTGTTCCTCGTGTGGGGTTGTGCAGTTATGATCTGTGCACTGTTCTGTATACACATTATGCTTCAAAATAACTTCACATAAAGAACATCTTATACC
ACAAGACAAGGAGCACACCCCAACACGTCAATACTAGACACGTGACAAGACATATGTGTAATACGAAGTTTTATTGAAGTGTATTTCTTGTAGAATATGG
3800
PvuI
CAGTTAATAGATAGAAGAGGAATAAGTAATAGGTCAAGACCATGCAGCTGGTAAGTGGGGGGGCCTGGGATCAAATAGCTACCTGCCTAATCCTGCCCTC
GTCAATTATCTATCTTCTCCTTATTCATTATCCAGTTCTGGTACGTCGACCATTCACCCCCCCGGACCCTAGTTTATCGATGGACGGATTAGGACGGGAG
3900
TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCCTTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACAACAGGCCTGCTATTTTCCTGGCATCTGTGCCCTGTTTGGCTAGCTAGGA
AACTCGGGACTTACTCAGACGGAAGGTCCCGAGTTCCACGAGTTGTTTTGTTGTCCGGACGATAAAAGGACCGTAGACACGGGACAAACCGATCGATCCT
4000
GCACACATACATAGAAATTAAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGGACAGAGGACAGAATTAACCTTGCCCAGACACTGGAAACCCATGTATGAACACTCA
CGTGTGTATGTATCTTTAATTTACTTTGTCTGGAAGTCGTTCCCCTGTCTCCTGTCTTAATTGGAACGGGTCTGTGACCTTTGGGTACATACTTGTGAGT
4100
CATGTTTGGGAAGGGGGAAGGGCACATGTAAATGAGGACTCTTCCTCATTCTATGGGGCACTCTGGCCCTGCCCCTCTCAGCTACTCATCCATCCAACAC
GTACAAACCCTTCCCCCTTCCCGTGTACATTTACTCCTGAGAAGGAGTAAGATACCCCGTGAGACCGGGACGGGGAGAGTCGATGAGTAGGTAGGTTGTG
4200
XmnI
ACCTTTCTAAGTACCTCTCTCTGCCTACACTCTGAAGGGGTTCAGGAGTAACTAACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTTGTCCTGC
TGGAAAGATTCATGGAGAGAGACGGATGTGAGACTTCCCCAAGTCCTCATTGATTGTGTCGTAGGGAAGGGAGTTTACTGACTGGTAGGGAAACAGGACG
4300
TTTGTTTTTCTTTCCAGTCAGTACTGGGAAAGTGGGGAAGGACAGTCATGGAAAAACTACATAAGGAAGCACCTTGCCCTTCTGCCTCTTGAGAATGTTG
AAACAAAAAGAAAGGTCAGTCATGACCCTTTCACCCCTTCCTGTCAGTACCTTTTTGATGTATTCCTTCGTGGAACGGGAAGACGGAGAACTCTTACAAC
4400

FIG. 13-7

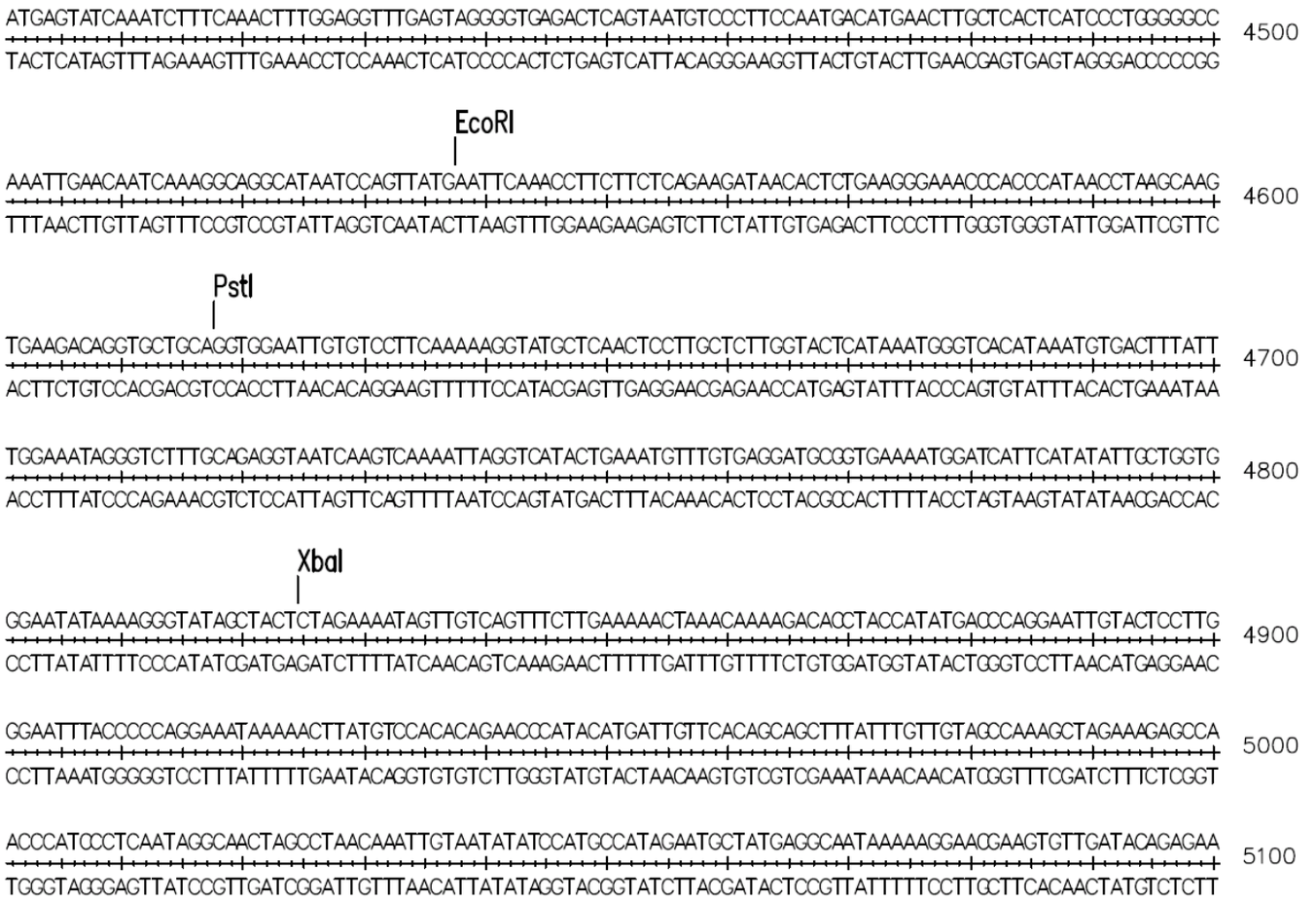

ATGAGTATCAAATCTTTCAAACTTTGGAGGTTTGAGTAGGGGTGAGACTCAGTAATGTCCCTTCCAATGACATGAACTTGCTCACTCATCCCTGGGGGCC
TACTCATAGTTTAGAAAGTTTGAAACCTCCAAACTCATCCCCACTCTGAGTCATTACAGGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGAGTAGGGACCCCCGG
4500
EcoRI
AAATTGAACAATCAAAGGCAGGCATAATCCAGTTATGAATTCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTGAAGGGAAACCCACCCATAACCTAAGCAAG
TTTAACTTGTTAGTTTCCGTCCGTATTAGGTCAATACTTAAGTTTGGAAGAAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTTGGGTGGGTATTGGATTCGTTC
4600
PstI
TGAAGACAGGTGCTGCAGGTGGAATTGTGTCCTTCAAAAAGGTATGCTCAACTCCTTGCTCTTGGTACTCATAAATGGGTCACATAAATGTGACTTTATT
ACTTCTGTCCACGACGTCCACCTTAACACAGGAAGTTTTTCCATACGAGTTGAGGAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGTATTTACACTGAAATAA
4700
TGGAAATAGGGTCTTTGCAGAGGTAATCAAGTCAAAATTAGGTCATACTGAAATGTTTGTGAGGATGCGGTGAAAATGGATCATTCATATATTGCTGGTG
ACCTTTATCCCAGAAACGTCTCCATTAGTTCAGTTTTAATCCAGTATGACTTTACAAACACTCCTACGCCACTTTTACCTAGTAAGTATATAACGACCAC
4800
XbaI
GGAATATAAAAGGGTATAGCTACTCTAGAAAATAGTTGTCAGTTTCTTGAAAAACTAAACAAAAGACACCTACCATATGACCCAGGAATTGTACTCCTTG
CCTTATATTTTCCCATATCGATGAGATCTTTTATCAACAGTCAAAGAACTTTTTGATTTGTTTTCTGTGGATGGTATACTGGGTCCTTAACATGAGGAAC
4900
GGAATTTACCCCCAGGAAATAAAAACTTATGTCCACACAGAACCCATACATGATTGTTCACAGCAGCTTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAGAGCCA
CCTTAAATGGGGGTCCTTTATTTTTGAATACAGGTGTGTCTTGGGTATGTACTAACAAGTGTCGTCGAAATAAACAACATCGGTTTCGATCTTTCTCGGT
5000
ACCCATCCCTCAATAGGCAACTAGCCTAACAAATTGTAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAAGGAACGAAGTGTTGATACAGAGAA
TGGGTAGGGAGTTATCCGTTGATCGGATTGTTTAACATTATATAGGTACGGTATCTTACGATACTCCGTTATTTTTCCTTGCTTCACAACTATGTCTCTT
5100

FIG. 13-8

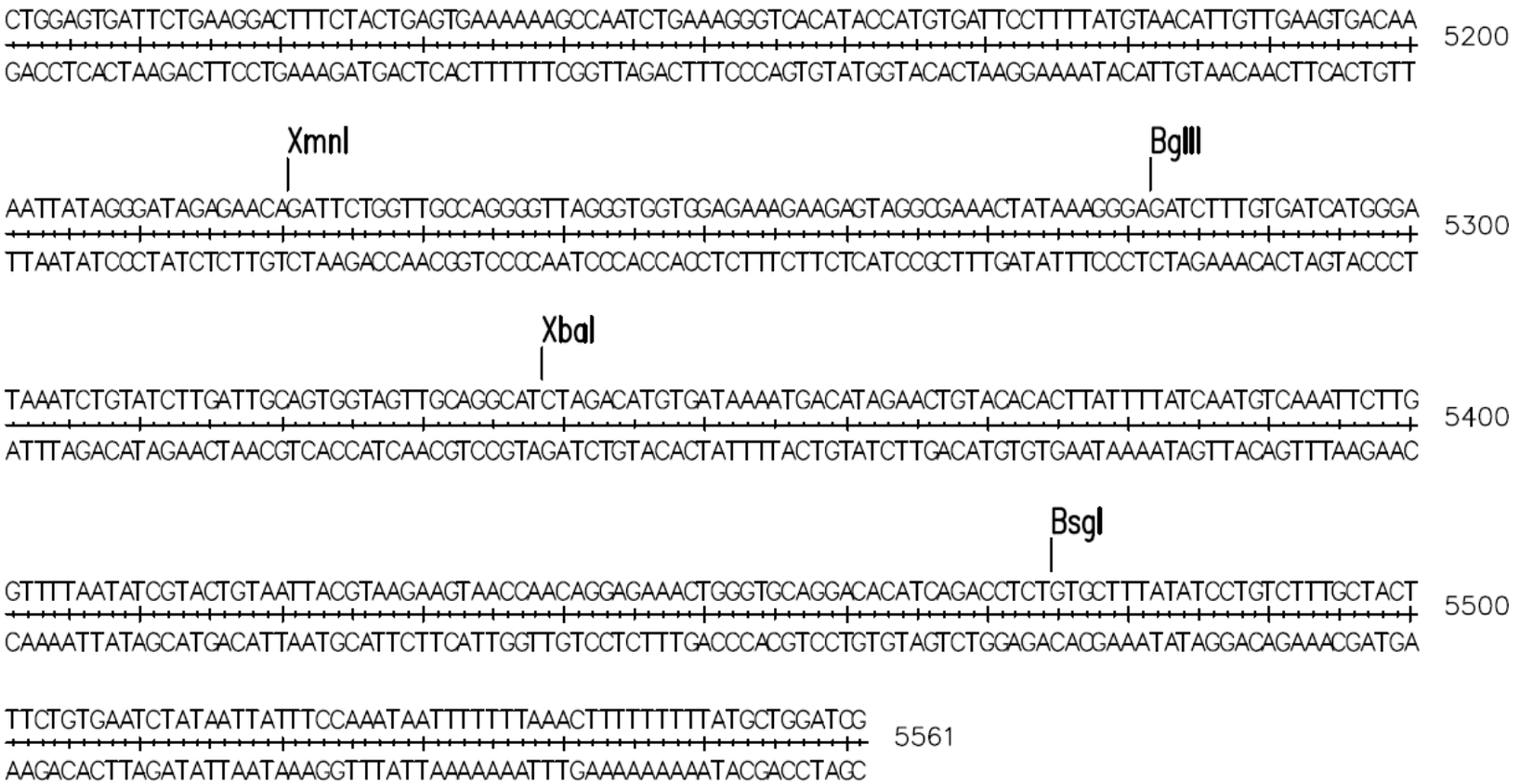

CTGGAGTGATTCTGAAGGACTTTCTACTGAGTGAAAAAAGCCAATCTGAAAGGGTCACATACCATGTGATTCCTTTTATGTAACATTGTTGAAGTGACAA
GACCTCACTAAGACTTCCTGAAAGATGACTCACTTTTTTCGGTTAGACTTTCCCAGTGTATGGTACACTAAGGAAAATACATTGTAACAACTTCACTGTT
5200
XmnI
BglII
AATTATAGGGATAGAGAACAGATTCTGGTTGCCAGGGGTTAGGGTGGTGGAGAAAGAAGAGTAGGCGAAACTATAAAGGGAGATCTTTGTGATCATGGGA
TTAATATCCCTATCTCTTGTCTAAGACCAACGGTCCCCAATCCCACCACCTCTTTCTTCTCATCCGCTTTGATATTTCCCTCTAGAAACACTAGTACCCT
5300
XbaI
TAAATCTGTATCTTGATTGCAGTGGTAGTTGCAGGCATCTAGACATGTGATAAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTTATCAATGTCAAATTCTTG
ATTTAGACATAGAACTAACGTCACCATCAACGTCCGTAGATCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGACATGTGTGAATAAAATAGTTACAGTTTAAGAAC
5400
BsgI
GTTTTAATATCGTACTGTAATTACGTAAGAAGTAACCAACAGGAGAAACTGGGTGCAGGACACATCAGACCTCTGTGCTTTATATCCTGTCTTTGCTACT
CAAAATTATAGCATGACATTAATGCATTCTTCATTGGTTGTCCTCTTTGACCCACGTCCTGTGTAGTCTGGAGACACGAAATATAGGACAGAAACGATGA
5500
TTCTGTGAATCTATAATTATTTCCAAATAATTTTTTTAAACTTTTTTTTTTATGCTGGATCG
AAGACACTTAGATATTAATAAAGGTTTATTAAAAAAATTTGAAAAAAAAAATACGACCTAGC
5561

FIG. 13-9

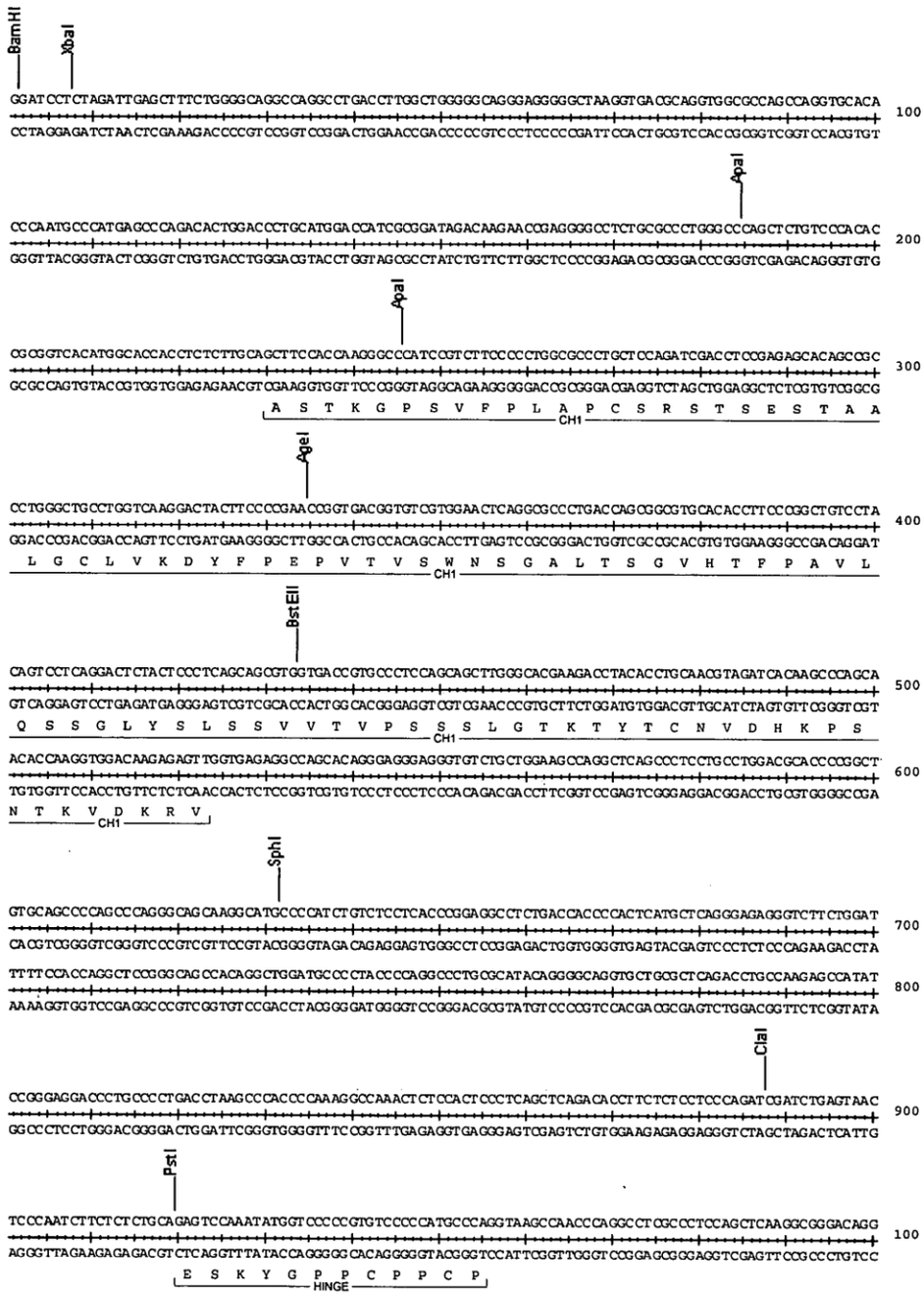

BamHI
XbaI
GGATCCTCTAGATTGAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTGGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGACGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACA
CCTAGGAGATCTAACTCGAAAGACCCCGTCCGGTCCGGACTGGAACCGACCCCCGTCCCTCCCCCGATTCCACTGCGTCCACCGCGGTCGGTCCACGTGT
100
ApaI
CCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACCCTGCATGGACCATCGCGGATAGACAAGAACCGAGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACAC
GGGTTACGGGTACTCGGGTCTGTGACCTGGGACGTACCTGGTAGCGCCTATCTGTTCTTGGCTCCCCGGAGACGCGGGACCCGGGTCGAGACAGGGTGTG
200
ApaI
CGCGGTCACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCTTCCACCAAGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGATCGACCTCCGAGAGCACAGCCGC
GCGCCAGTGTACCGTGGTGGAGAGAACGTCGAAGGTGGTTCCCGGGTAGGCAGAAGGGGGACCGCGGGACGAGGTCTAGCTGGAGGCTCTCGTGTCGGCG
300
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A
CH1
AgeI
CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCCTA
GGACCCGACGGACCAGTTCCTGATGAAGGGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAGTCCGCGGGACTGGTCGCCGCACGTGTGGAAGGCCGACAGGAT
400
L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
CH1
BstEII
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCA
GTCAGGAGTCCTGAGATGAGGGAGTCGTCGCACCACTGGCACGGGAGGTCGTCGAACCCGTGCTTCTGGATGTGGACGTTGCATCTAGTGTTCGGGTCGT
500
Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S
CH1
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCGGCT
TGTGGTTCCACCTGTTCTCTCAACCACTCTCCGGTCGTGTCCTCCCTCCCACAGACGACCTTCGGTCCGAGTCGGGAGGACGGACCTGCGTGGGGCCGA
600
N T K V D K R V
CH1
SphI
GTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGAT
CACGTCGGGGTCGGGTCCCGTCGTTCCGTACGGGGTAGACAGAGGAGTGGGCCTCCGGAGACTGGTGGGGTGAGTACGAGTCCCTCTCCCAGAAGACCTA
700
TTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATAT
AAAAGGTGGTCCGAGGCCCGTCGGTGTCCGACCTACGGGATGGGGTCCGGGACGCGTATGTCCCGTCCACGACGCGAGTCTGGACGGTTCTCGGTATA
800
ClaI
CCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCGATCTGAGTAAC
GGCCCTCCTGGGACGGGACTGGATTCGGGTGGGGTTTCCGGTTTGAGAGGTGAGGGAGTCGAGTCTGTGGAAGAGAGGAGGGTCTAGCTAGACTCATTG
900
PstI
TCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCGTGTCCCCCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGG
AGGGTTAGAAGAGACGTCTCAGGTTTATACCAGGGGGCACAGGGGGTACGGGTCCATTCGGTTGGGTCCGGAGCGGGAGGTCGAGTTCCGCCCTGTCC
100
E S K Y G P P C P P C P
HINGE

FIG 14 -1

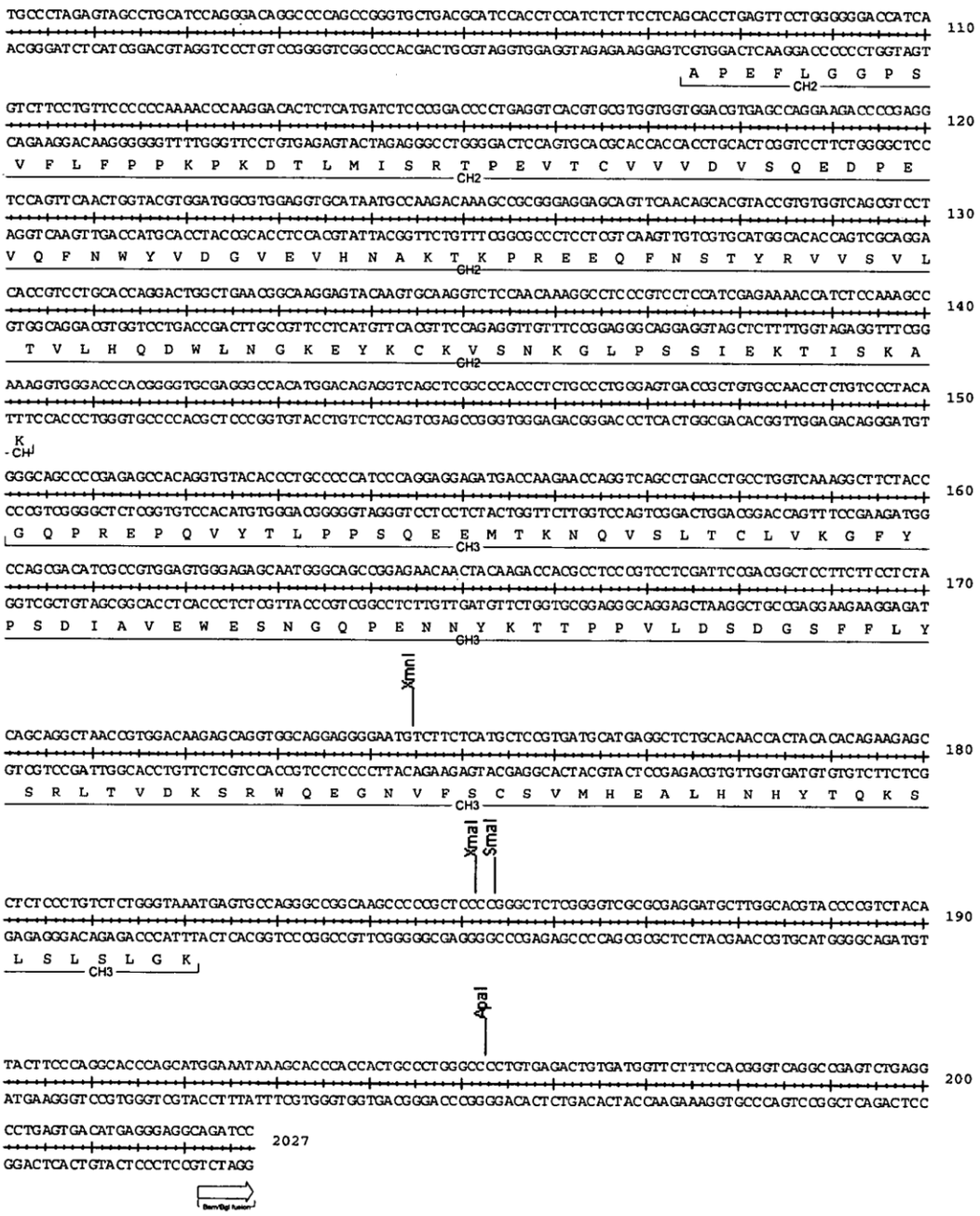

XmnI
XmaI
SmaI
ApaI
CH2
CH3
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
2027

FIG 14 -2

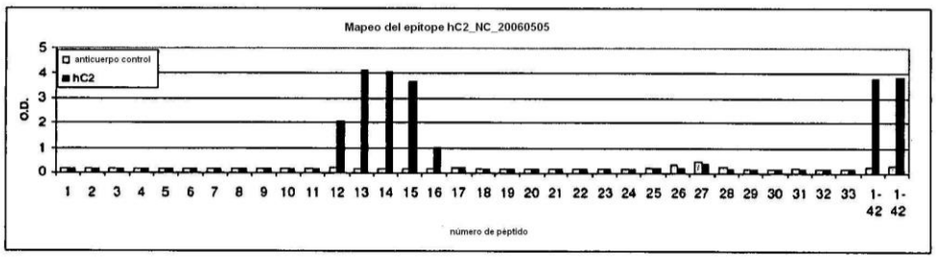


Figura 1. hC2 se une a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la librería de péptidos Aβ 1-42.
La unión de hC2 a los péptidos de Aβ 1-42 que se sobreponen se analizó mediante ELISA. La unión a la Aβ 1-42 completa y la unión de un anticuerpo quimérico de que no se une (anticuerpo control) se utilizaron como controles positivos y negativos, Respectivamente. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia de Aβ 1-42 en donde inicia el péptido. Los resultados se expresan como OD.

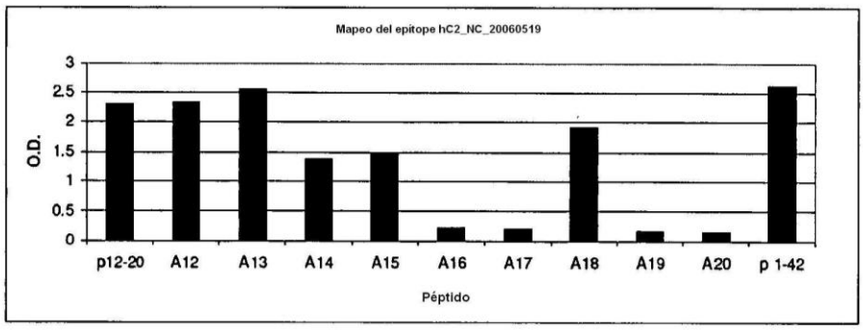


Figura 2. La unión de hC2 a Aβ 12-20 depende completamente de los aa 16, 17, 19 y 20 y depende parcialmente de los aa 14, 15 y 18.
La unión de hC2 a Aβ 12-20 y la Aβ 12-20 sustituida con alanina se analizaron mediante ELISA. La unión a la Aβ 1-42 completa se utilizó como control positivo. El número corresponde al aminoácido que está sustituido con alanina. Los resultados se expresan como OD.

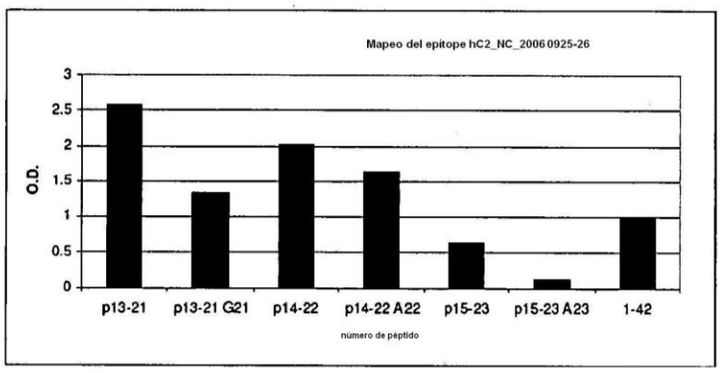


Figura 3. La unión de hC2 a Aβ 15-23 depende del aa 23 y depende ligeramente del aa 22.
La unión de hC2 a Aβ 13-21 y la Aβ 14-22 o 15-23 y a 13-21G21, 14-22A22 o 15-23A23 se analizó mediante ELISA. La unión a la Aβ 1-42 completa se utilizó como control positivo. Los resultados se expresan como OD.

Fig 15

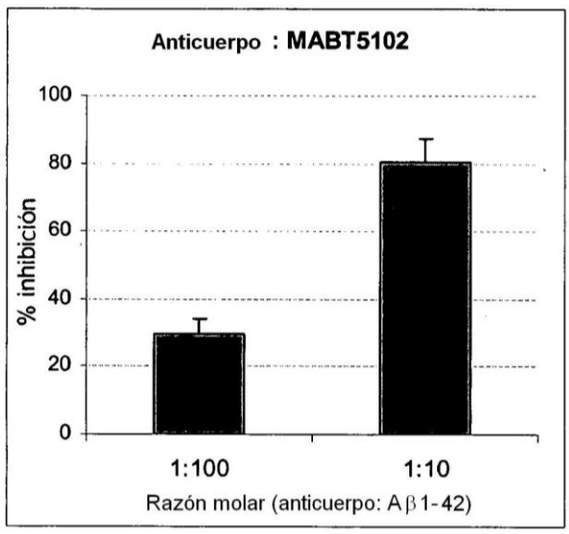

Anticuerpo : MABT5102
100
80
60
40
20
0
% inhibición
1:100
1:10
Razón molar (anticuerpo: Aβ1-42)

FIG. 16

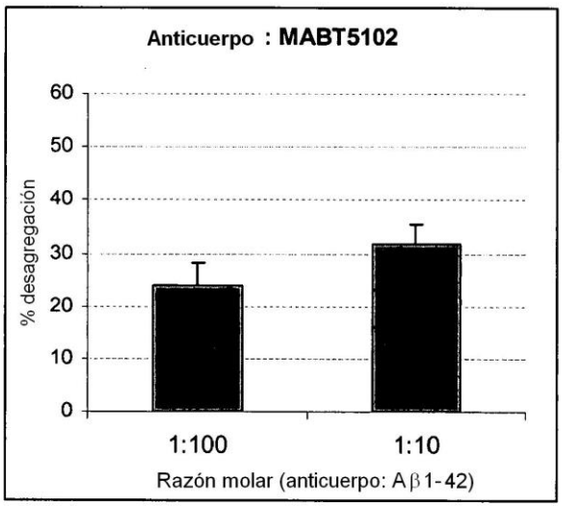

Anticuerpo : MABT5102
60
50
40
30
20
10
0
% desagregación
1:100
1:10
Razón molar (anticuerpo: Aβ1-42)

FIG. 17

HOJA SUBSTITUTA (REGLA 26)

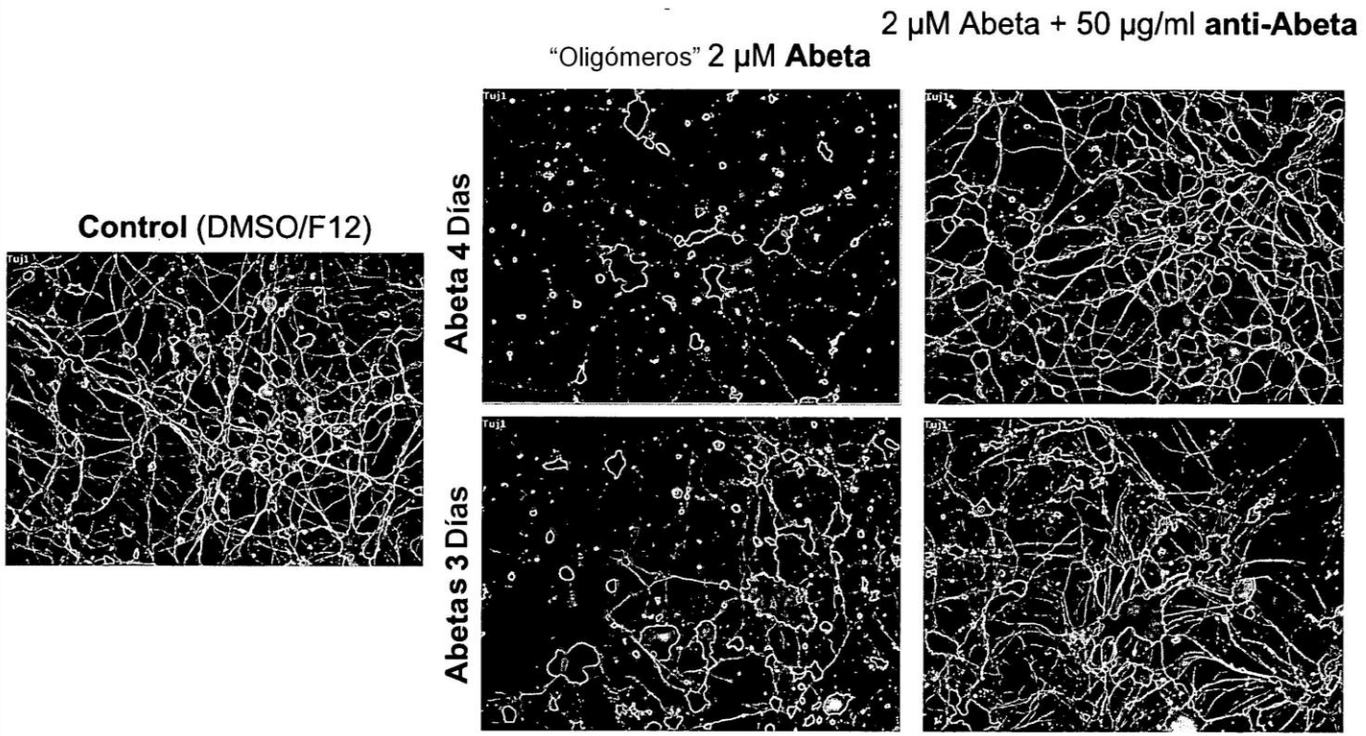


FIG. 18