

Referencia Oficial: 15 771 953.5
Solicitante: Neurimmune Holding AG
Título: ANTICUERPO DE REPETICIONES DE ANTIDIPEPTIDO (DPRS)
DERIVADO HUMANO
Nuestra Referencia: BIO20104PCTEP
Fecha: 13 de diciembre de 2019

Declaración

Mia Marie Rushe

Científico principal, descubrimiento de fármacos biológicos, Biogen, Inc

I. Resumen

1. Mi nombre es **Mia Merie Rushe**. He trabajado en el campo de la bioquímica de proteínas.
2. Al preparar esta declaración, he revisado la solicitud de patente europea EP 3201228 titulada " ANTICUERPO DE REPETICIONES DE ANTIDIPEPTIDO (DPRS) DERIVADO HUMANO", presentada el 30 de septiembre de 2015 ("la presente solicitud") y las reivindicaciones actualmente pendientes. También he revisado la Comunicación de conformidad con la Regla 164 (2) (b) y el Artículo 94 (3) EPC de fecha 10 de julio de 2019 y el estado de la técnica citado en la comunicación, a saber: D1 (WO 2014/114303 A1), D2 (K. Mori et al.), D3 (K. Mori et al.), D4 (Ian R. Mackenzie et al.), D5 (WO 2014/114660 A1), y D6 (May S. et al.).
3. Además, me he familiarizado con la objeción de la Oficina Examinadora sobre la supuesta falta de actividad inventiva y la falta de suficiencia de divulgación.
4. En particular, entiendo que la Oficina Examinadora ha rechazado el objeto de las reivindicaciones de la presente solicitud en base a los anticuerpos descritos en las referencias de la técnica anterior D4 o cualquiera de D5, D1 y D6. También entiendo que la Oficina de Examen considera que un efecto terapéutico de los anticuerpos reivindicados en el tratamiento/prevenición de una enfermedad asociada con una proteína DPR o formas agregadas de la misma es meramente especulativo.
5. El propósito de esta Declaración es mostrar que los anticuerpos que comprenden las secuencias CDR específicas comprendidas en las SEC ID N°: 8 y 10 de la presente solicitud tienen propiedades ventajosas que los hacen particularmente útiles para fines de diagnóstico y también terapéuticos. Los resultados de los experimentos descritos a continuación demuestran la eficacia terapéutica de los anticuerpos reivindicados.
6. Precisamente, el anticuerpo A que comprende las VH CDRs específicas 1, 2 y 3 comprendidas en SEQ ID NO: 8 (es decir, posiciones 32-36, 51-67 y 100-113, respectivamente) y VL CDRs 1, 2 y 3 comprendidas en la SEC ID NO: 10 (es decir, las posiciones 25-35, 51-57 y 90-98, respectivamente) de la presente solicitud redujo inesperadamente el poli (GA) en experimentos de línea celular in vitro. El tratamiento con el anticuerpo A disminuyó los niveles de poli (GA) de una manera dependiente de

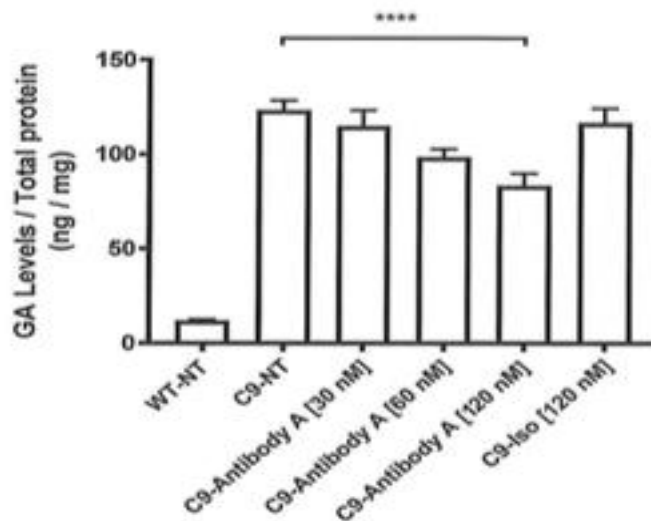
la dosis en neuronas motoras derivadas de C9orf72 iPSC y también la cantidad de agregados de poli (GA) en líneas celulares de glioblastoma humano T98G. Además, se proporcionan datos que ilustran que el tratamiento con el Anticuerpo B, es decir, un análogo quimérico de ratón del Anticuerpo A, proporcionó un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo en ratones C9orf72-500R BAC Tg humanos.

II. Niveles reducidos de Poly (GA) de anticuerpo A de una manera dependiente de la dosis en neuronas motoras derivadas de iPSC C9orf72

7. Se examinaron los efectos del anticuerpo A sobre la eliminación de proteínas poli (GA) en neuronas motoras iPSC derivadas de pacientes de tipo salvaje (WT) y C9ORF 72. Las iPSC se diferenciaron en neuronas motoras espinales utilizando un protocolo adaptado de Maury Y. et al. (Nat Biotechnol. 2015 Jan; 33 (1): 89-96), que genera precursores de neuronas motoras por 14 días in vitro (DIV) y ~ 75% de neuronas positivas para beta-tubulina positiva (TUJ1 +) en 28 DIV. 30 nM, 60 nM y 120 nM de control hlgG1 y los anticuerpos Anticuerpo A se administraron a medios de cultivo a partir de 5 DIV y se reponían con cambios de medios y anticuerpos cada tres días hasta 15 DIV. Las células se lisaron en un búfer RIPA a 15 DIV, el sobrenadante se hirvió posteriormente en TCEP1 SDS/1mM al 1% y se analizó para determinar los niveles de poli (GA) usando un inmunoensayo de descubrimiento a escala Meso (MSD) como se describe en Nguyen et al. (Neuron (2019), <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.007>).
8. En las células WT, no se detectó poli (GA) y todas las células WT tratadas con este anticuerpo se comportaron de manera similar en el ensayo de poli (GA) MSD. En cultivos derivados de pacientes C9ORF72, el tratamiento con el Anticuerpo A resultó en una disminución dependiente de la dosis en los niveles de poli (GA) en comparación con las células no tratadas y las células tratadas con un anticuerpo de control de isotipo (ver Figura 1, más abajo).

Figura 1: Niveles de poli (GA) en neuronas IPSC tratadas con anticuerpo A

Niveles de GA en cultivos de iPSC tratados con el anticuerpo A



Anticuerpo A = anticuerpo hlgG1 que comprende VH CDRs 1 (NHAMH), 2 (VISYDGENTYYADSIIEG) y 3 (GGRRGHFTSYLDY), y VL CDRs 1 (RASQNIDKYLN), 2 (AASSLHS) y 3 (QSYSSFRT).

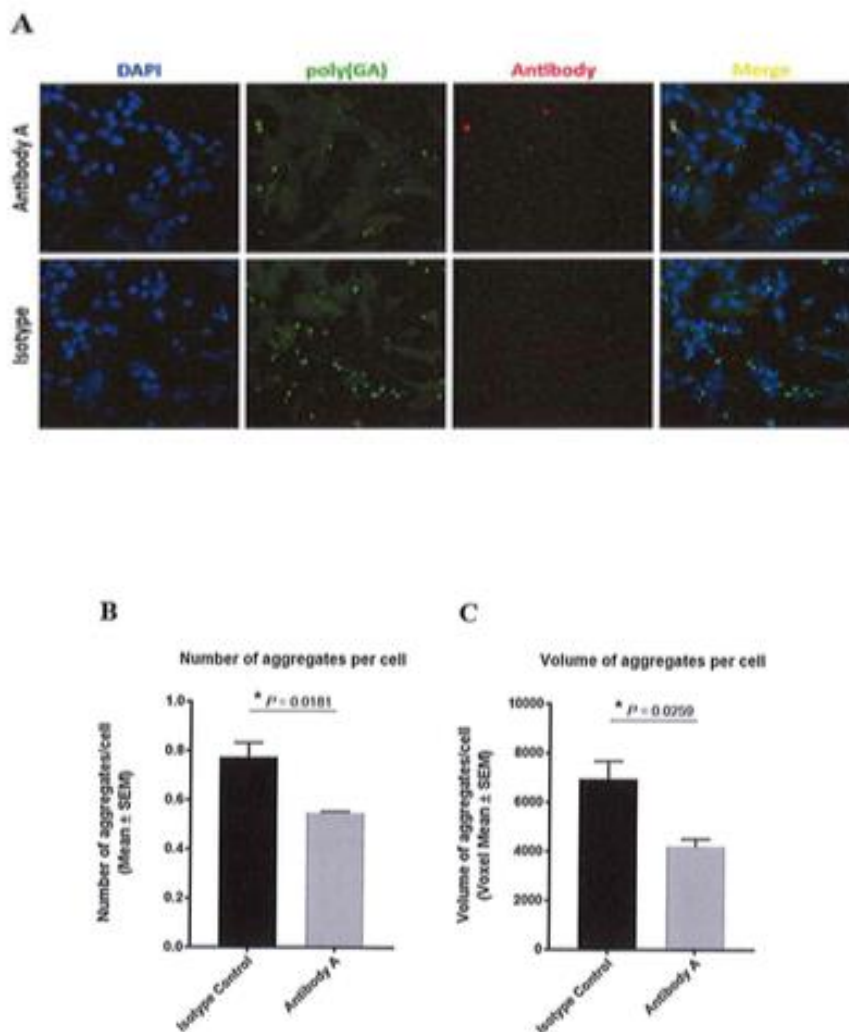
GA = glicina-alanina; iPSC = célula madre pluripotente inducida; NT = no tratado; WT = células de tipo salvaje, C9 = células C9ORF 72, C9-Iso = células C9ORF72 tratadas con anticuerpo isotipo hlgG1; C9-Anticuerpo A = células t C9ORF72 tratadas con el Anticuerpo A.

Medición cuantitativa de poli (GA) en neuronas iPSC usando MSD (n = 2 / grupo de tratamiento, donde los niveles de poli (GA) se midieron dos veces por muestra), ANOVA unidireccional con análisis de comparación múltiple de Tukey. En comparación con los controles no tratados o IgG, las neuronas motoras derivadas de pacientes con iPSC tratadas con el anticuerpo A durante 8 días exhiben niveles reducidos de GA, respectivamente, según lo determinado por MSD.

III. El anticuerpo A reduce los agregados de poli (GA) en las líneas celulares de glioblastoma T98G

9. Con el fin de examinar si el tratamiento de las células que expresan poli (GA) con el anticuerpo A reduce el número y el tamaño de los agregados de poli (GA), las células de glioblastoma T98G estables e inducibles que sobreexpresan ATG iniciando la formación sin horquilla (GA)₁₆₁-GFP fueron tratados con 100 nM de Anticuerpo A o anticuerpo de control IgG1 humano durante 72 horas. Después del tratamiento, las células se fijaron, se tiñeron con IgG anti-humano conjugado AlexaFluor 647 y se tomaron imágenes.
10. El análisis de imagen demostró que el anticuerpo A colocalizado con agregados de poli (GA) mientras que el control del isotipo no se observó en las células (ver Figura 2A, más abajo). Se usó fluorescencia GFP para cuantificar el número y el volumen (vóxeles) de agregados de poli (GA) por célula.
11. El tratamiento con el anticuerpo A redujo el número de agregados por célula en un 29% (véase la Figura 2B, a continuación) y redujo el volumen (voxel) de agregados de poli (GA) por célula en un 39% (véase la Figura 2C, a continuación) en relación con el tratamiento con control de isotipo.

Figura 2: Cuantificación agregada de poli (GA) en células T98G tratadas con anticuerpo A



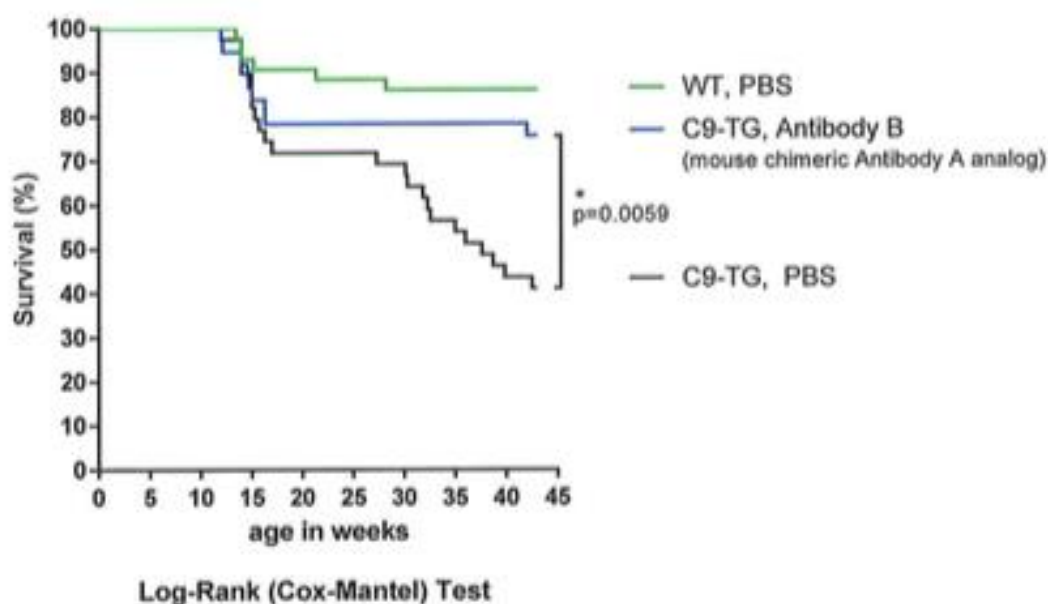
SEM = Error estándar de la media

(A) Doble inmunofluorescencia de células T98G inducibles estables que expresan (GA)₁₆₁-GA (verde) y tratadas con anticuerpo 100 nM (rojo) durante 72 h. Colocalización observada en células tratadas con el anticuerpo A pero no en células tratadas con anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano. (B, C) En comparación con las células tratadas con control de isotipo IgG, las células tratadas con anticuerpo A mostraron una reducción significativa en el número de agregados de poli (GA) por célula (B) y una reducción significativa en el volumen de agregados por célula (C). El tratamiento con anticuerpos se realizó por triplicado biológico y se capturaron 10 u 11 campos distintos para cada réplica biológica. Las barras representan la media + SEM; los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba t de dos colas no apareadas; ns $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

IV. **El tratamiento con anticuerpos B mejora la supervivencia en ratones C9ORF72-500R humanos BAC Tg**

12. Para evaluar la capacidad de los anticuerpos poli (GA) de la presente solicitud para mejorar la supervivencia in vivo, se utilizó un modelo de ratón transgénico. En detalle, los ratones C9ORF72-500R BAC Tg (ver Liu et al., 4 de mayo de 2016, Neuron 90,521-534) fueron tratados con el Anticuerpo B (un análogo quimérico de ratón del Anticuerpo A que contiene las CDR específicas del Anticuerpo A y las regiones constantes de ratón IgG2a) o PBS.
13. Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento con anticuerpos B prolongó significativamente el tiempo de supervivencia en ratones tratados. Los ratones tratados con el anticuerpo B mostraron una supervivencia del 76% frente a una supervivencia del 41% de los ratones C9ORF72-500R Tg BAC tratados con placebo. Se encontró que la diferencia en la supervivencia era estadísticamente significativa ($p = 0.0169$).

Figura 3: Aumento de la supervivencia en ratones C9ORF2-500R humanos BAC Tg que recibieron el anticuerpo B



BAC = cromosoma artificial bacteriano; GA = glicina-alanina; GP = glicina-prolina; IP = intraperitoneal; PBS = solución salina tamponada con fosfato; WT = tipo salvaje; WT, PBS = ratones de tipo salvaje con PBS; C9-TG, anticuerpo B = ratones transgénicos C9ORF72-500R tratados con el análogo quimérico de ratón del anticuerpo A (que contiene regiones variables del anticuerpo A y regiones constantes de ratón IgG2a); C9-TG, PBS = ratones transgénicos C9ORF72-500R tratados con PBS

Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de animales tratados con Anticuerpo B dirigido contra poli (GA). Las inyecciones semanales de IP del anticuerpo B a 30 mg/kg mejoraron significativamente la supervivencia de C9ORF72-500R ($p = 0.0059$). Se realizó una prueba

estadística de rango de registro (Mantel-Cox) para determinar la importancia del beneficio de supervivencia.

14. En conjunto, estos datos muestran que los anticuerpos que comprenden las secuencias específicas de VH y VL CDR de la reivindicación 1 redujeron los niveles de poli (GA) y la agregación de poli (GA) en cultivos celulares in vitro y prolongaron significativamente la supervivencia de los ratones tratados in vivo. Los datos proporcionados confirman que la combinación específica de CDR conduce a propiedades que hacen que los anticuerpos sean particularmente útiles para fines terapéuticos.

Firmado el 13 de Dic de 2019 en Cambridge, M A .

[Firma]
Mia Marie Rushe

Adjuntos

Curriculum Vitae (Anexo EXHIBIT C)