



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 862 427**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2017 PCT/EP2017/067067**
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011073**
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2017 E 17739940 (9)**
⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021 EP 3484916**

⑮ Título: **Anticuerpos específicos para tau hiperfosforilada y métodos de uso de los mismos**

⑩ Prioridad:

12.07.2016 DK 201600416
04.01.2017 DK 201700005
04.01.2017 DK 201700008
14.03.2017 DK 201700179

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

⑬ Titular/es:

H. LUNDBECK A/S (100.0%)
Ottiliavej 9
2500 Valby-Copenhagen, DK

⑭ Inventor/es:

PEDERSEN, JAN, TORLEIF;
KJÆRGAARD, KRISTIAN;
PEDERSEN, LARS, ØSTERGAARD;
ASUNI, AYODEJI ABDUR-RASHEED;
ROSENQVIST, NINA, HELEN;
DAECHSEL, JUSTUS, CLAUS, ALFRED;
JUHL, KARSTEN;
TAGMOSE, LENA;
MARIGO, MAURO;
JENSEN, THOMAS;
CHRISTENSEN, SØREN;
DAVID, LAURENT;
VOLBRACHT, CHRISTIANE y
HELBO, LONE

⑮ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 862 427 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos para tau hiperfosforilada y métodos de uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva clase de anticuerpos monoclonales que se une específicamente al resto de serina 396 fosforilado de la proteína tau patológica hiperfosforilada (PHF) (pS396), así como a métodos de uso de estas moléculas y sus fragmentos de unión a tau en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de tauopatías.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia son uno de los mayores desafíos sociales en la actualidad. La Organización Mundial de la Salud estima que los costes de la atención de las personas mayores seguirán aumentando y que el número de casos de demencia diagnosticados se triplicará para 2050 (World Health Organization and Alzheimer's Disease International - Status Report (2012) DEMENTIA: A public health priority, WHO). Los primeros tratamientos para la EA fueron moduladores de neurotransmisores tales como inhibidores de la acetilcolina esterase y moduladores de NMDA. Estas terapias estuvieron disponibles en el cambio de milenio y todavía constituyen la piedra angular para el alivio sintomático de los déficits de memoria relacionados con la demencia y la EA. Sin embargo, estos fármacos no se dirigen a las causas subyacentes de la EA: acumulación de péptido amiloide-β (Aβ) y agregados de proteína tau y pérdida asociada de sinapsis neuronales y, finalmente, de neuronas.

Ciertos estudios comunitarios longitudinales realizados con ancianos (Weiner, M.W. *et al.* (2014) ADNI online: <http://www.adni-info.org/>; Breteler, M.M. *et al.* (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 23-28; Launer, L.J. (1992) Neuroepidemiology 11 Suppl 1, 2-13) junto con otros grandes estudios de asociación de todo el genoma (Lambert, J.C. *et al.* (2013) Nat. Genet. 45, 1452-1458) han demostrado que la EA es una mezcla heterogénea de demencias donde hasta el 10 por ciento de los pacientes con EA avanzada carecen de patología amiloide (Crary, J.F. *et al.* (2014) Acta Neuropathol. 128, 755-766). Además, ciertos estudios patológicos seminales de Braak y Braak (Braak, H. y Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12) demostraron una clara correlación entre el grado de patología de ovillos neurofibrilares y el estado cognitivo antes de la autopsia. Estas observaciones se han reforzado por varios investigadores (Nelson, P.T. *et al.* (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381) y en estudios longitudinales recientes de biomarcadores que indican que los niveles en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de tau y de tau hiperfosforilada aumentan durante las etapas iniciales y tardías de la enfermedad (Jack, C.R., Jr. *et al.* (2013) Lancet Neurol. 12, 207-216).

Tal como se ha indicado anteriormente, la proteína asociada a los microtúbulos, tau, y su versión hiperfosforilada forman el componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares, que son una de las principales señales de identidad de la EA. Además, ciertas variantes genéticas específicas de tau están asociadas con formas familiares de demencia frontotemporal (DFT). La aparición de la patología de tau en la EA tiene lugar en un patrón espacial característico al comenzar en la corteza entorinal y continuar en el hipocampo y en áreas corticales (Braak, H. y Braak, E. (1996) Acta Neurol. Scand. Suppl 165, 3-12). El estadio específico de la patología de tau también se correlaciona bien con las capacidades cognitivas (Nelson, P.T. *et al.* (2012) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 71, 362-381; Braak, E. *et al.* (1999) Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 249 Suppl 3, 14-22). En conjunto, esta evidencia constituye la base de una hipótesis basada en tau para la EA. La hipótesis implica que la acumulación intracelular de tau conduce a la degeneración de los microtúbulos y a un colapso espinal. Como resultado, se produce una comunicación defectuosa entre las neuronas y muerte celular. Recientemente, también se ha demostrado que la propia tau puede formar una especie endopatógena que puede transmitir la neurodegeneración de una célula a otra (Clavaguera, F. *et al.* (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913).

I. Tau como endopatógeno

Clavaguera y sus colaboradores han demostrado que la propia tau puede actuar como endopatógeno (Clavaguera, F. *et al.* (2009) Nat. Cell Biol. 11, 909-913). Se aislaron extractos de cerebro obtenidos a baja velocidad de centrifugación a partir de ratones transgénicos tau P301S (Allen, B. *et al.* (2002) J. Neurosci. 22, 9340-9351), se diluyeron y se inyectaron en el hipocampo y áreas corticales de ratones ALZ17 jóvenes. El ratón ALZ17 es una línea de ratón transgénico tau que solo desarrolla patología tardía (Probst, A. *et al.* (2000) Acta Neuropathol. 99, 469-481). Los ratones ALZ17 inyectados desarrollaron rápidamente patología filamentosa sólida, y la administración de extractos de cerebro inmunoempobrecidos deficitarios en tau de ratones P301S o extractos de ratones de tipo silvestre no indujo patología de tau. El fraccionamiento de los extractos cerebrales en tau soluble (S1) e insoluble en sarcosílo (P3) (Sahara, N. *et al.* (2013) J. Alzheimer's. Dis. 33, 249-263) y la inyección de estos en ratones ALZ17 demostró que la fracción P3 es la más competente para inducir patología. Contiene la mayor parte de la tau filamentosa hiperfosforilada intracelular. También podría inducirse la mayor parte de la patología al inyectar extractos de P301S en el cerebro de ratones de tipo silvestre, pero no se formaron ONF. En estudios posteriores, Clavaguera *et al.* han demostrado que la tau humana extraída de tejido cerebral post-mortem de otras tauopatías (enfermedad de granos argirofílicos (EGA), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB) también pueden inducir patología de tau en el modelo ALZ17 (Clavaguera, F. *et al.* (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 9535-9540). Desde la presentación

de estos datos, se han notificado varios modelos distintos de siembra y propagación de tau (Ahmed, Z. *et al.* (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 667-683; Walker, L.C. *et al.* (2013) *JAMA Neurol.* 70, 304-310). La principal conclusión de estos estudios indica un mecanismo por el cual la tau patógena en inclusiones intracelulares se secreta desde la célula al espacio periplásmico. Después, el material patológico de tau se transporta a lo largo de la vaina vesicular tanto en dirección anterógrada como retrógrada y posteriormente es absorbido por las células vecinas mediante endocitosis masiva. Este mecanismo explica por qué la propagación de la patología observada en la enfermedad humana sigue un patrón anatómico diferente. Curiosamente, la administración periférica de tau patológica puede acelerar la formación de patología de tau en ratones ALZ17 (Clavaguera, F. *et al.* (2014) *Acta Neuropathol.* 127, 299-301). Este mecanismo de propagación puede explicar la extensión de la enfermedad en otras proteinopatías (Goedert, M. *et al.* (2010) *Trends Neurosci.* 33, 317-325; Sigurdsson, E.M. *et al.* (2002) *Trends Mol. Med.* 8, 411-413).

II. Especie de tau

El descubrimiento de que la proteína tau puede actuar como un endopatógeno ha generado una búsqueda de "especies patógenas" que podrían ser la diana de posibles terapias de intervención.

El gen de la proteína tau asociada a los microtúbulos (MAPT) se encuentra en el cromosoma 17 del genoma humano y expresa seis isoformas de la proteína tau en el cerebro humano adulto. Estas isoformas surgen del corte y empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 de los 16 exones dentro del gen MAPT. Los exones 2 y 3 expresan una repetición de 29 aminoácidos y el exón 10 expresa un dominio de unión a microtúbulos adicional. Como resultado, las isoformas de tau contendrán 0, 1 o 2 repeticiones N-terminales y 3 o 4 dominios de unión a microtúbulos C-terminales (tau 3R o 4R). Normalmente se expresan seis isoformas de tau. Las isoformas más largas (2N4R) y más cortas (ON3R) consisten en 441 y 352 aminoácidos, respectivamente (Kolarova, M. *et al.* (2012) *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 731526). El dominio de proyección N-terminal de tau (2N4R) consiste en una cola rica en glicina de 44 aminoácidos y los restos 45-102 abarcan dos regiones muy ácidas (dominios N1, N2). En los restos 151-243 se encuentran dos regiones ricas en prolina (dominios P1, P2). El resto de la proteína está constituido por cuatro dominios de unión a microtúbulos (R1-R4), seguidos de una región C-terminal corta.

Tau es una proteína soluble y altamente lábil a la fosforilación. Aproximadamente el 20 por ciento u 85 restos de aminoácido en la isoforma más larga de tau son sitios potenciales de fosforilación (Ser, Thr o Tyr). Se ha observado experimentalmente que aproximadamente la mitad de estos restos están fosforilados (Hanger, D.P. *et al.* (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054), y los sitios de fosforilación están agrupados alrededor de los restos terminales de los dominios de unión a microtúbulos. Tau se fosforila y desfosforila de manera dinámica durante el ciclo celular. Debe disociarse de los microtúbulos para permitir que se produzca la mitosis. Su función principal en las células posmitóticas (la neurona diferenciada) es actuar como estabilizador de los microtúbulos para permitir un transporte axonal óptimo. Solo puede asociarse con los microtúbulos en su forma mayoritariamente desfosforilada, por lo tanto, la fosforilación actúa como un interruptor directo de asociación/disociación de microtúbulos dentro de la neurona. En condiciones normales, la tau citosólica contiene en promedio dos sitios fosforilados. En el material filamento helicoidal emparejado, están fosforilados al menos 7-8 sitios (Hanger, D.P. *et al.* (2009) *Trends Mol. Med.* 15, 112-119; Hasegawa, M. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17047-17054). La tau filamento helicoidal emparejada es una señal de identidad clave de la enfermedad de Alzheimer (Kosik *et. al.* (1986) *PNAS*, 86, 4044-4048), se observa un cambio de movilidad característico de la tau hiperfosforilada en el análisis inmunocitoquímico del material del cerebro humano con EA.

Ha sido difícil estudiar la proteína tau con técnicas estructurales tradicionales como la cristalografía de rayos X o la espectroscopía de RMN, lo cual refleja su naturaleza metaestable. Estos estudios se han realizado principalmente en fragmentos de dominio de la proteína tau no fosforilada. El único estudio estructural hasta la fecha sobre tau de longitud completa (2N4R), utilizando espectroscopía de RMN, revela que la proteína contiene solo tramos escasos de estructura secundaria estable (Mukrasch, M.D. *et al.* (2009) *PLoS. Biol.* 7, e34). Este análisis indica que la estructura secundaria de la cadena principal del péptido tiene una gran propensión a adaptar una estructura de lámina β . Los primeros 200 restos de la cadena principal están considerablemente más ordenados que el extremo C-terminal que abarca los dominios de unión a microtúbulos. La presencia de muchas interacciones específicas de largo alcance dentro de la proteína en solución indica que existe en un estado globular fundido en gran parte desordenado (Ohgushi, M. y Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* 164, 21-24).

Se han identificado productos de proteasa de tau generados, en particular, por caspasa y calpaína (Asp13, Glu391 y Asp421) en material de ovillos (Gamblin, T.C. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10032-10037). En particular, se ha estudiado en detalle el truncamiento en Asp421 utilizando el anticuerpo tau C3, que se une al extremo Asp421 libre. Este truncamiento se ha postulado como un evento temprano en la patogénesis de la EA asociado con la inducción de apoptosis (deCalignon A. *et al.* (2010) *Nature* 464, 1201-1204). La escisión N-terminal en Asp13 y la escisión C-terminal en Glu391 se consideran eventos tardíos en la patogénesis (deCalignon A. *et al.* (2010) *Nature* 464, 1201-1204; Delobel, P. *et al.* (2008) *Am. J. Pathol.* 172, 123-131). Recientemente, se identificó un fragmento N-terminal adicional (restos 1-224) en LCR de pacientes con EA y PSP, y se ha planteado la hipótesis de que es un marcador temprano de la enfermedad y particularmente patógeno (documento US14/092539; Bright, J. *et al.* (2014) *Neurobiol. Ageing*, 1-17). Otros grupos informaron sobre un fragmento similar escindido por calpaína (Ferreira, A. y Bigio, E.H. (2011) *Mol. Med.* 17, 676-685; Reinecke, J.B. *et al.* (2011) *PLoS. One.* 6, e23865).

Aparte de la hiperfosforilación y la fragmentación de tau, se ha propuesto la acetilación posttraduccional (Cohen, T.J. *et al.* (2011) *Nat. Commun.* 2, 252; Min, S.W. *et al.* (2010) *Neuron* 67, 953-966) y O-GlcNAcylation (Zhu, Y. *et al.* (2014) *J. Biol. Chem.*) como procesos que definen patologías en la formación de patologías de ovillos asociadas con la EA.

5 III. Inmunoterapias de tau

Las inmunoterapias se dividen tradicionalmente en enfoques de vacunas pasivas y activas. En un enfoque de vacuna activa, un agente patógeno, o una forma patógena inactivada del mismo, se inyecta en el paciente y el sistema inmunitario provoca una respuesta inmunitaria. Esto desencadena la maduración de las células B generando anticuerpos de alta afinidad o respuesta celular contra el antígeno administrado. En un enfoque de vacuna pasiva, se evita la activación del sistema inmunitario mediante la infusión de un anticuerpo específico contra el antígeno. El sistema de eliminación inherente luego elimina el ligando unido al anticuerpo.

10 15 AC Immune está buscando un anticuerpo monoclonal de ratón contra la fosfoserina 409 de tau. Se perfilaron anticuerpos contra la EA humana y tejido cerebral de control y se seleccionaron en función de su capacidad para reconocer la patología de ovillos. Las versiones humanizadas de dos anticuerpos, hACI-36-2B6-Ab1 y hACI-36-3A8-Ab1, se unen a un epítopo de tau dentro de los aminoácidos 401-418 (documento WO 2013/151762).

20 25 El grupo de Roger Nitsch ha aislado autoanticuerpos contra tau de ancianos sanos sin signos de tauopatía degenerativa. Se han aislado varios anticuerpos usando tau humana recombinante de longitud completa (2N4R) para encontrar anticuerpos específicos de tau. A continuación, se analizó la capacidad de estos anticuerpos para discriminar los aislados de tau entre enfermedades e individuos sanos. En la bibliografía de patentes se han descrito tres anticuerpos principales, 4E4, 4A3 y 24B2 (documentos WO2012049570; US2012087861). Su mapeo de epítopos indica que los tres reconocen aminoácidos dentro y en el extremo C de la región de unión a microtúbulos, desde la posición V339 a la K369. Estos anticuerpos no presentan ninguna fosfoespecificidad.

30 35 C2N Diagnostics se centra principalmente en el desarrollo de herramientas de diagnóstico para la detección temprana de enfermedades neurodegenerativas. Se generaron anticuerpos contra la proteína tau humana y de ratón de longitud completa. Se identificaron ocho y cinco anticuerpos, que reconocían tau humana y de ratón, respectivamente (Yanamandra, K. *et al.* (2013) *Neuron* 80, 402-414). Se seleccionaron tres anticuerpos con diferentes cinéticas de unión para la evaluación *in vivo*. Concretamente, HJ9.3, HJ9.4 y HJ8.5, que reconocían los restos 306-320, 7-13 y 25-30 de tau, respectivamente, siendo el último (HJ8.5) específico para tau humana. Los anticuerpos también se seleccionaron en función de su capacidad para prevenir la transferencia de la patología en un ingenioso ensayo indicador del mecanismo de la propagación transcelular de tau (Sanders, D.W. *et al.* (2014) *Neuron* 82, 1271-1288; Kfoury, N. *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 19440-19451). Su evaluación en estudios de inyección crónica de i.c.v. en ratones transgénicos P301S demostró su capacidad para reducir los niveles de proteína tau hiperfosforilada como se determina en el análisis inmunohistoquímico de los ratones tratados.

40 45 Los anticuerpos de Peter Davies se desarrollaron originalmente como herramientas de diagnóstico que podían diferenciar entre tau patológica y normal en material de cerebro con EA y de control (Greenberg, S.G. y Davies, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5827-5831). Se mostró la evaluación de la utilidad terapéutica de los anticuerpos PHF1 y MC1 en P301S y JPNL3 (P301L) (Boutajangout, A. *et al.* (2011) *J. Neurochem.* 118, 658-667; Chai, X. *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 34457-34467; D'Abramo, C. *et al.* (2013) *PLoS. One.* 8, e62402 mice). PHF1 reconoce un epítopo fosfo-tau lineal (pS396, pS404) mientras que MC1 es un anticuerpo dependiente de la conformación que reconoce un epítopo tau estructural que requiere dos partes distintas de la secuencia lineal, un epítopo dentro de los restos 46-202 y un epítopo C-terminal entre los restos 312-342 (Jicha, G.A. *et al.* (1997) *J. Neurosci. Res.* 48, 128-132). La inyección de estos dos anticuerpos en estudios de inmunización crónica de 12 a 13 semanas dio como resultado una reducción sustancial de la patología en la médula espinal y el tronco encefálico entre otras regiones del cerebro, lo que se tradujo en una atenuación del déficit motor observado en estos ratones. (D'Abramo, C. *et al.* (2013) *PLoS. One.* 8, e62402).

50 55 iPerian/Bristol Meyers Squibb ha desarrollado anticuerpos tau contra una especie de tau patológica postulada, compuestos por un fragmento N-terminal de tau (etau: restos 1-224), que promovieron la hiperactividad en cultivos neuronales basados en células madre pluripotentes inducidas. Se ha desarrollado un abanico de anticuerpos, pero la caracterización se ha centrado en los anticuerpos IPN001 e IPN002 que reconocen un epítopo N-terminal dentro de los restos 9-18. Por consiguiente, estos anticuerpos detectan niveles elevados de tau en el LCR de pacientes con PSP y EA estadiificadas, que pueden ser un signo temprano de enfermedad. Las inyecciones *in vivo* de los anticuerpos en ratones JPNL3 (P301L) condujeron a una reversión parcial de los déficits motores progresivos (documento US14/092539).

Einar Sigurdsson informó sobre el primer programa que demuestra la eficacia de la inmunoterapia basada en tau. Se utilizó una vacuna activa que consistía en péptido tau 379-408 [pS396, pS404] junto con adyuvante Adju-Phos para inmunizar ratones JPNL3 (P301L). En este estudio, se observó una reducción importante de la patología de tau en los ratones tratados con la vacuna en comparación con los animales de control. También se detectó una atenuación del fenotipo motor relacionado con la tauopatía. Su eficacia se confirmó en un modelo de ratón diferente (htau/PS1) no dirigido por tau mutante (Boutajangout, A. *et al.* (2011) AAIC 2011 (7, número 4, Suplemento edn) p. s480-s431;

Congdon, E.E. *et al.* (2013) J. Biol. Chem. 288, 35452-35465; Gu, J. *et al.* (2013) J. Biol. Chem. 288, 33081-33095).

Prothena ha evaluado tres anticuerpos tau en el ratón transgénico para tau K369I (K3) y en un modelo de ratón P301L. Se seleccionaron anticuerpos con propiedades variables para la evaluación *in vivo*. Se inyectaron dos anticuerpos específicos para pS404 con isotipo diferente (IgG1/k e IgG2a/k) o un anticuerpo anti-tau total (pan) (IgG1/k) en un paradigma crónico. Los ratones K369I se trataron con inyecciones semanales durante 21 semanas a partir de las 3 semanas de edad, y los ratones P301L se trataron durante 7 meses con inyecciones semanales a partir de los 4 meses de edad. Se observó una reducción en las inclusiones neurofibrilares positivas para tau en los ratones K3 con el anticuerpo IgG2a/k para pS404. Los dos anticuerpos específicos para pS404 fueron capaces de reducir el nivel de tau positiva para pS422, mientras que no se observó reducción alguna en los ratones tratados con pananticuerpo para tau. Estos estudios sugieren que: 1) la eliminación de tau puede depender del isotipo del anticuerpo y; 2) puede ser importante dirigirse a una especie de tau que sea relevante para la enfermedad, ya que el anticuerpo anti-tau total no pudo reducir la tau hiperfosforilada (documento PCT/US2014/025044).

En el catálogo de Invitrogen n.º 35-5300, de fecha 1 de octubre de 2008 (2008-10-01) se describe un anticuerpo comercial de ratón anti-Phospho-Tau 396.

15 En el catálogo de productos de Abcam, con fecha 1 de enero de 2014 (01/01/2014) se describe un anticuerpo comercial anti-tau (phospho S396).

El documento WO 2012/045882 describe anticuerpos específicos para pS396 A4-2A1-18, A4-2A1-40, A4-4A6-18 y A6-1 D2-12.

20 El documento WO 2013/050567 describe antibióticos específicos anti-Tau que se unen a pS396: ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-4A6-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1, ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3 y ACI-35-205-Ab1.

ROSSEELS *ET AL.*, J. Bio Chem, vol. 290, n.º 7, 24 de diciembre de 2014 (2014-12-24), páginas 4059-4074, describe el Ac P-S396 específico anti-Ser(P)396 disponible comercialmente.

25 Los inventores de la presente invención han descubierto que, sorprendentemente, los anticuerpos específicos para el resto 396 de serina fosforilado de tau (pS396) son eficaces en modelos de enfermedad; esto contrasta con los anticuerpos de la técnica anterior que reconocen principalmente las proteínas tau fosforiladas en los restos 396 y 404, fosforiladas solo en el resto 404 o en otros restos de tau.

30 Los inventores han desarrollado anticuerpos que además tienen una especificidad y selectividad notables para la tau patológica humana. Los anticuerpos descritos en la presente memoria muestran un grado mucho mayor de especificidad y selectividad hacia la tau patológica humana con respecto a la tau no patológica que los anticuerpos del documento WO2013/050567 (véase la Figura 1 del documento WO2013/050567). Los anticuerpos del documento WO2012/045882 que, según se había notificado, tenían una unión específica, se indujeron con secuencias de 6 a 9 restos de aminoácido de Tau, los aminoácidos 393-401, 396-401, 394-400 y 393-400. Esto contrasta con los anticuerpos descritos en la presente memoria que se indujeron contra tau hiperfosforilada patógena que comprendía una secuencia de aminoácidos más larga como se describe en la presente memoria.

35 Además, los anticuerpos, y fragmentos de unión a epítopo de los mismos, descritos en la presente memoria muestran muchas características ventajosas tales como la capacidad para discriminar entre la proteína tau humana patológica y no patológica y, en particular, para unirse a la proteína tau asociada con la patología de Alzheimer (EA). En estudios electrofisiológicos, los anticuerpos, y fragmentos de unión a epítopo de los mismos, descritos en la presente memoria fueron además capaces de revertir la facilitación por pulsos pareados reducida y la minicorriente excitatoria sináptica espontánea (mEPSC).

Compendio de la invención

40 La presente invención está definida por las reivindicaciones. La descripción que comprende la invención se refiere a anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a epítopo de los mismos capaces de unirse específicamente al resto de serina 396 fosforilado de la proteína tau humana (isoforma 2N4R) (**SEQ ID NO: 1**). Los anticuerpos se caracterizan además por su capacidad para discriminar entre los restos fosforilados 396 y 404 de manera que básicamente no se unen al resto 404 fosforilado.

45 Los anticuerpos de la descripción son selectivos para la tau patológica en presencia de tau no patológica, pero fosforilada. Los anticuerpos de la descripción son capaces de reducir selectivamente los ovillos de tau debidos a la proteína tau patológica en presencia de tau normal. Sin quedar ligados a una teoría en particular, se cree que la reducción de los ovillos de tau que comprenden la proteína tau que se ha fosforilado en la posición 396 de tau previene la siembra de tau patológica en los ovillos de tau. Por consiguiente, un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse de selectivamente a tau fosforilada en el resto 396 incluso cuando tales moléculas están en presencia de proteína tau que se ha fosforilado en la posición 404 de tau. Un aspecto relacionado de la descripción se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse selectivamente a tau fosforilada en el resto 396 incluso cuando tales moléculas están en presencia de tau no patógena. Además, la descripción se refiere a un anticuerpo selectivo para tau patológica, siendo dicha tau patológica tau hiperfosforilada que aparece como una banda de 64 kDa

(mediante análisis de transferencia de Western) en ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma 2N4R humana de tau.

Un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo anti-tau que, cuando se usa con extractos inmunoenpobrecidos deficitarios en rTg4510 de ratones transgénicos, reduce específicamente las bandas de tau hiperfosforilada de 64 kDa y 70 kDa en al menos un 90 %, reduciendo al mismo tiempo la banda de tau de 55 kDa en no más de un 10 %. Un aspecto adicional de la descripción se refiere a un anticuerpo anti-tau que reduce específicamente las bandas de tau hiperfosforilada de 64 y 70 kDa en al menos un 90 %, reduciendo al mismo tiempo la banda de tau de 55 kDa en no más de un 10 %; o que tiene la capacidad, cuando se usa como se describe en la presente memoria con extractos de cerebros post-mortem de seres humanos con EA, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforilada pS396 en al menos un 90 %, sin reducir las bandas de tau no hiperfosforiladas en más de un 10 %.

Otro aspecto de la descripción se refiere a un método para tratar a un paciente con una tauopatía, tal como la enfermedad de Alzheimer, que comprende reducir los ovíos o atenuar la progresión de dichos ovíos, comprendiendo dichos ovíos Tau hiperfosforilada, comprendiendo dicho método poner en contacto Tau hiperfosforilada con un anticuerpo de la descripción de manera que se reduzcan los ovíos, se reduzca su contenido de tau hiperfosforilada o se atenúe la progresión de la formación de ovíos.

Como alternativa, la descripción se refiere a un método para tratar a un paciente con una tauopatía, tal como la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método poner en contacto ovíos con un anticuerpo selectivo para tau que tiene el resto 396 fosforilado de tal manera que en el ovo se reduce la cantidad de Tau hiperfosforilada.

En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal contra tau humana hiperfosforilada, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 40; y SEQ ID NO: 46;**
- (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 41; y SEQ ID NO: 47;**
- (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 42; y SEQ ID NO: 48;**
- (d) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 52; y SEQ ID NO: 55;**
- (e) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 53; y SEQ ID NO: 56; y**
- (f) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 54; y SEQ ID NO: 57.**

En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal contra tau humana hiperfosforilada, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende:

- (a) una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; y**
- (b) una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; y SEQ ID NO: 27.**

En la presente memoria se describe además un anticuerpo monoclonal contra tau humana hiperfosforilada, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3;**
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4;**
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5;**
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6;**
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7; y**
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8.**

En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal contra tau humana hiperfosforilada, o fragmento de

unión a epítopo del mismo, que comprende:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 5 y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal contra tau humana hiperfosforilada, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**;
- y que además comprende al menos uno de
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 15 y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; y
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**.

20 Los anticuerpos, y fragmentos de unión a epítopo de los mismos, de la descripción se pueden utilizar en el tratamiento de tauopatías tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de granos argirofílicos (EGA), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), LCT (lesión cerebral traumática, leve, aguda o crónica) y encefalopatía traumática crónica (ETC).

25 Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos de la descripción están destinados además a usarse en el tratamiento de psicosis, particularmente de psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, y apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ensayo de inhibición en fase fluida para la captura de AD-P3 utilizando C10-2 humanizado y variantes (C10-2_N32S y C10-2_N32S_A101T). Como se describe en el Ejemplo 3A, se investigó la inhibición dependiente de la concentración de la captura de AD-P3 por anticuerpos específicos de P396 hC10-2 (cuadrados), hC10-2_N32S (círculos negros) y hC10-2_N332_A101T (círculos blancos). La fracción AD-P3 se incubó durante 60 min a temperatura ambiente (t/a) con concentraciones crecientes de anticuerpos (0-1000 nM) antes de la incubación con 200 ng/ml de anticuerpo C10-2 de ratón inmovilizado en placas de 96 pocillos. Los antígenos AD-P3 capturados se detectaron con anticuerpo anti-tau total (MSD) marcado con sulfo.

35 La CI50 de los anticuerpos hC10-2_N32S (círculos negros) y hC10-2_N332_A101T (círculos blancos) calculada es de 44 nM y 14 nM, respectivamente. Esto supone una mejora notable con respecto a hC10-2, como se puede ver al comparar las curvas de la Figura 1. Por consiguiente, en un aspecto de la invención, los anticuerpos inhiben AD-P3 en el ensayo de inhibición en fase fluida descrito en la presente memoria, de manera que la señal se reduce en un 50 % a una concentración de 100 nM o menor del anticuerpo basándose en el ensayo de inhibición en fase fluida para la captura de AD-P3.

40 **Figura 2. Ensayo de inhibición de péptidos que ilustra la afinidad aparente de hC10-2 y de variantes relacionadas.** Como se describe en el Ejemplo 3B, se investigó la inhibición dependiente de la concentración de la unión del anticuerpo en una solución en fase fluida al péptido Ptau 386-408 (pS396) con anticuerpos hC10-2 (cuadrados), hC10-2_N32S (círculos negros) y hC10-2_N32_A101T (círculos blancos). Los anticuerpos se preincubaron a 1 ng/ml durante 60 min a t/a con concentraciones crecientes (0-10000 nM) de Ptau 386-408 (pS396) antes de la incubación en pocillos recubiertos con 100 ng/ml de Ptau 386-408 (pS396/pS404). El anticuerpo unido a los pocillos se detectó con anticuerpo anti-IgG humana (MSD) marcado con sulfo.

Como se puede observar en la Figura 2, el anticuerpo hC10.2 (CI50 = 24 nM), el anticuerpo hC10.2_N32S (CI50 = 50 nM) y el anticuerpo hC10.2_N32S_A101T (CI50 = 34 nM) tienen valores de CI50 menores de 100 nM, e incluso menores de 60 nM. Basándose en estudios de afinidad aparente utilizando una solución en fase fluida con Ptau (P396) 386-408.

5 **Figura 3 (Paneles AZ y AA-AG). Detección inmunohistoquímica de tau patológica en cerebros post mortem de donantes con EA y en cerebro de ratón rTg4510.** Como se describe en el Ejemplo 4, en la corteza prefrontal de 3 donantes diferentes con EA, hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T marcaron ovillos neurofibrilares, hilos del neurópilo y neuritas distróficas. Las intensidades de tinción más fuertes se detectaron con las concentraciones más altas de anticuerpo. Las secciones de cerebro de control están desprovistas de inmunorreactividad. Los 3 anticuerpos 10 marcaron tau fosforilada en el cerebro rTg4510 con patología avanzada.

La tinción aumentó de hC10-2 a hC10-2_N32S y a hC10-2_N32S_A101T. Las máximas intensidades de tinción se detectaron con hC10-2_N32S_A101T, después con hC10-2_N32S y después con hC10-2. A concentraciones tan bajas como 100 ng/ml de hC10-2_N32S_A101T y hC10-2_N32S, hubo detección inmunohistoquímica de tau patológica en cerebros con Alzheimer.

15 **Figura 4 (Paneles A-F). Marcaje de estructuras tau en ratones rTg4510 tratados con hC10-2. Se administró hC10.2 i.v.** (Los paneles A, C, E y F representan rTg4510; los paneles B y D representan tTA). Los ratones recibieron una única inyección de un volumen de 150 μ l de anticuerpos hC10-2 a una concentración de 80 mg/kg. Se cogieron cortes de cerebro después de 3 días de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 5. hC10-2 marca específicamente las estructuras diana *in vivo* en hipocampo y corteza en cerebros rTg4510, pero no en los cerebros 20 tTA de control. Se muestran imágenes emparejadas para la señal de AlexaFluor488 y Hoechst en secciones del hipocampo.

25 **Figura 5 (Paneles AF). Marcaje de estructuras tau en ratones rTg4510 tratados con hC10-2_N32S.** (Los paneles A, C y E representan rTg4510; los paneles B, D y F representan tTA). Los ratones recibieron una única inyección de un volumen de 150 μ l de anticuerpos hC10-2_N32S a una concentración de 80 mg/kg. Se cogieron cortes de cerebro después de 3 días de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 5. hC10-2_N32S marca específicamente las estructuras diana *in vivo* en hipocampo y corteza en cerebros rTg4510, pero no en los cerebros tTA de control. Se muestran imágenes emparejadas para la señal de AlexaFluor488 y Hoechst en secciones del hipocampo.

30 **Figura 6 (Paneles AF). Marcaje de estructuras tau en ratones rTg4510 después de la inyección i.v. de hC10-2_N32S_A101T** (Los paneles A, C y E representan rTg4510; los paneles B, D y F representan tTA). Los ratones recibieron una única inyección de un volumen de 150 μ l de anticuerpos hC10-2_N32S_A101T a una concentración de 80 mg/kg. Se cogieron cortes de cerebro después de 3 días de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 5. hC10-2_N32S_A101T marca específicamente las estructuras diana *in vivo* en hipocampo y corteza en cerebros rTg4510, pero no en los cerebros tTA de control. Se muestran imágenes emparejadas para la señal de AlexaFluor488 y Hoechst en secciones del hipocampo.

35 La comparación de las Figuras 4-6 indica que hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T atraviesan la barreira hematoencefálica tras la inyección intravenosa. Las Figuras indican además que hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T marcan las estructuras tau (inmunorreactivas a los ovillos de tau) del hipocampo y la corteza con resultados mejorados en comparación con hC10-2.

40 **Figura 7 (Paneles A-D). Especies de Tau reconocidas por anticuerpos específicos de pS396 en cerebro con enfermedad de Alzheimer (EA).** Como se describe en el Ejemplo 6, en secciones de cerebro con EA, los ovillos de tau se marcaron conjuntamente por anticuerpos E1 y p396 o fueron positivos para anticuerpos pS396 solos (flechas). Las secciones se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Varios ovillos de tau solo se marcaron con anticuerpos hC10-2 y hC10-2_N32S_A101T (flechas). Dado que los ovillos fantasma no se tiñen con anticuerpos tau N-terminales, las especies de tau marcadas por anticuerpos hC10-2 o hC10-2_N32S_A101T solo probablemente 45 representan ovillos fantasma extracelulares.

50 **Figuras 8A-8C. Detección de tau patológica por transferencia de Western.** Como se describe en la sección del Ejemplo 6 "Detección de tau patológica por transferencia de Western", se detectó tau patológica con hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T mediante transferencia de Western. Se fraccionaron prosencéfalos recogidos de tres ratones rTg4510 y compañeros de camada de control no transgénicos (no tg) sacrificados a las 32 semanas de edad y muestras corticales recogidas de cuatro ratones AD y cuatro donantes de control sanos (HC), respectivamente, en fracción soluble (S1), sedimento soluble en TBS (S1p) y fracción insoluble en sarkosyl (P3) y se analizaron mediante transferencia de Western para determinar tau fosforilada en el epítopo de pS396 con 1 μ g/ml de hC10.2 (A), hC10-2_N32S (B) y hC10-2_N32S_A101T (C). En rTg4510, la tau 4R0N humana normal se muestra a 55 kDa, mientras que las especies de tau hiperfosforiladas se muestran a 64 kDa y 70 kDa. En EA, las especies de tau hiperfosforiladas se muestran como cuatro bandas de 54, 64, 69 kDa y 74 kDa, con una cantidad variable de rotis típico de EA.

55 Tanto hC10-2 como hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T son selectivos para las proteínas tau de ratones rTg4510 con respecto a los ratones no transgénicos y para los donantes con EA con respecto a los donantes de control sanos. Además, en las fracciones soluble (S1), sedimento soluble en TBS (S1p) e insoluble en sarkosyl (P3), tanto hC10-2

como hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T son selectivos para la proteína tau patógena de 64 kDa de ratones rTg4510 con respecto a la proteína tau normal de 55 kDa de ratones rTg4510.

Figura 9. Immunoprecipitación de tau de cerebros con EA. Como se describe en la sección del Ejemplo 6 "Immunoprecipitación de tau patológica", se analizó la immunoprecipitación de tau con 10 µg de hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T utilizando IgG1 humana (IgG1) como control obtenida a partir de 500 µg de lisados preclarados de homogeneizados de cerebro cortical procedentes de cuatro donantes con EA y donantes de control sanos (HC) mediante transferencia de Western con anticuerpo policlonal de conejo anti-tau pS396 (tau pS396). En EA, las especies de tau hiperfosforiladas se muestran como cuatro bandas de 54, 64, 69 kDa y 74 kDa, con una cantidad variable de rotis típico de EA.

Figura 10 A-C Cuantificación de la agregación de tau mediante ensayo de Cisbio. El material de siembra de tipo silvestre (Wt) (WW) no mostró siembra y se restó la señal de fondo de todas las muestras sembradas. Los homogeneizados de Tg4510 produjeron siembras de manera eficiente y el efecto de siembra no se vio afectado por el tratamiento con B12, pero se vio afectado en diversos grados por el tratamiento, en estudios de siembra realizados a una concentración de 20 µg/ml con anticuerpos tau de la invención (hC10-2_N32S_A101T>hC10-2_N32S>hC10-2). Los gráficos representan los resultados de cuatro conjuntos independientes de experimentos y se representan como agregación de tau relativa (factor de multiplicación de la señal con respecto al efecto de fondo normalizado para la proteína total) y la tau p396 insoluble relativa se cuantificó mediante densitometría de transferencias de Western de la fracción insoluble en tritón-X (factor de multiplicación de la señal con respecto al efecto de fondo normalizado). Todas las muestras se normalizaron con respecto al anticuerpo de control de isótipo B12. La Figura 10 BC presenta una cuantificación de la agregación de tau mediante el ensayo de Cisbio. Las células HEK293 pcDNA sembradas no mostraron señal, confirmando la ausencia de detección para el material de siembra de entrada. El material de siembra Wt (de tipo silvestre) (WW) no mostró siembra, sin embargo, los homogeneizados de rTg4510 (CC) produjeron siembra de manera eficiente, en comparación con la ausencia de siembra. Este efecto de siembra no se vio afectado por el tratamiento con HEL, pero se revirtió parcialmente mediante el tratamiento con anticuerpos tau (C10-2>D1.2>hACI36-2B6-Ab1). Los gráficos representan tres conjuntos independientes de muestras y se representan como agregación de tau relativa (factor de multiplicación de la señal con respecto al efecto de fondo normalizado para la proteína total). El Ejemplo 6, en la sección "Células y ensayo de agregación", se describe el protocolo seguido.

Figura 11. Cuantificación de la señal de transferencia de Western de Tau5 después del inmunoempobrecimiento de extractos de cerebro con EA usando diferentes cantidades de anticuerpo hC10-2 y 2.10.3. Como se describe en el Ejemplo 7, los dos anticuerpos eliminaron una pequeña fracción de tau total de los extractos de cerebro con Alzheimer.

Figura 12. Cuantificación de la señal de transferencia de Western de Tau P-S422 después del inmunoempobrecimiento de extractos de cerebro con EA usando diferentes cantidades de anticuerpo hC10-2 (rombos) y 2.10.3 (triángulos). La figura muestra los resultados del Ejemplo 7. La tau fosforilada en la serina 422 se puede eliminar eficazmente de los extractos de cerebro con EA mediante inmunoempobrecimiento utilizando hC10-2 o 2.10.3. Ambos anticuerpos eliminaron más del 90 % de Tau P-S422, pero se necesitaba más cantidad del anticuerpo 2.10.3 para conseguir el mismo efecto.

Figura 13. Cuantificación de la señal de transferencia de Western de Tau pS396 después del inmunoempobrecimiento de extractos de cerebro con EA usando diferentes cantidades de anticuerpo hC10-2 y 2.10.3. La figura muestra los resultados del Ejemplo 7. El inmunoempobrecimiento con hC10-2 eliminó el 88 % de tau fosforilada en la serina 396, mientras que 2.10.3 solo eliminaba el 55 % de Tau pS396 de extractos de cerebro con EA.

Figura 14. Cuantificación de la señal de transferencia de Western de Tau P-S199/202 después del inmunoempobrecimiento de extractos de cerebro con EA usando diferentes cantidades de anticuerpo hC10-2 y 2.10.3. La figura muestra los resultados del Ejemplo 7. El inmunoempobrecimiento con hC10-2 eliminó el 69 % de la tau que estaba fosforilada en la serina 199/202. El anticuerpo 2.10.3 no produjo la misma reducción dependiente de la dosis.

Figura 15. Extractos de cerebro con enfermedad de Alzheimer en una transferencia de Western antes y después del inmunoempobrecimiento. La figura muestra los resultados del Ejemplo 7. Hay un fragmento de Tau de 25 kDa fosforilado en la serina 396. El inmunoempobrecimiento usando hC10-2 dio como resultado una reducción de la banda de Tau de 25 kDa. Los otros 2 anticuerpos fosfoespecíficos 2.10.3 y AT8 no eliminaron esta especie de 25 kDa.

Figura 16. Cuantificación de la señal de transferencia de Western de Tau pS396 después del inmunoempobrecimiento de extractos de cerebro con EA usando diferentes cantidades de variantes de hC10-2 N32S, N32Q, N32S_A101T, N32Q_A101T, N32Q_D55E y N32S_D55E. Como se puede concluir del Ejemplo 8, la capacidad de los anticuerpos de la invención para eliminar tau fosforilada en la serina 396 de homogeneizados de cerebro con EA fue sustancial. Con menos de 0,1 µg de anticuerpo (punto de datos a 75 ng), las variantes produjeron una disminución en la señal de pS396 de al menos un 28 % (excepto para N32Q, D55E que fue del 16 %) mientras que C10.2 produjo una disminución de la señal de pS396 de menos del 6 %.

Figura 17 (Paneles A-D). Siembra de ovillos de tau en el hipocampo, causada por la inyección de extractos de cerebro con EA. Como se realizó en el Ejemplo 8a, a una dosis de 15 mg/kg, el tratamiento con mC10-2 redujo significativamente la patología de ovillos en el hipocampo sembrado en un 57 % (P<0,05). Hubo una tendencia clara que indicaba que hC10-2 también reducía la patología. Por el contrario, 2.10.3 no mostró efecto a la misma dosis.

5 **Figura 18. El resto P-Ser396 y Tyr394 están en el centro del sitio de unión a antígeno**

Se muestra la estructura de Ile(392)-Val(393)-Tyr(394)-Lys(395)-pSer(396)-Pro(397)-Val(398). En la principal interacción con el anticuerpo de la inyección está implicada la cavidad hidrófoba, pSer396 e Y394 del péptido tau. Existe una extensa red de enlaces de hidrógeno formada e interacciones de carga/polares entre la cadena lateral de Y(394) y la cadena principal con el fosfonato de pSer396. La CDR1 de HC de los anticuerpos de la inyección comprende el motivo palindrómico de 8 restos AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - AA CARGADO - AA CARGADO - AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR (Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-Thr-Ile-His). Los restos cargados interaccionan a través de una extensa red de enlaces formada por enlaces de hidrógeno, interacciones de carga/carga y de carga/polar entre el anticuerpo y la proteína tau.

10 **Figura 19. Eficacia de los anticuerpos en el paradigma de tratamiento**

15 Como se realizó en el Ejemplo 8b, Se sembraron células HEK293 que expresaban hTau-P301L con homogeneizados de Tg4510 preincubados con los anticuerpos indicados, se trisnizaron y se sembraron de nuevo 24 horas después (se volvieron a añadir los anticuerpos) y se recogieron 48 horas después de la siembra. Los homogeneizados celulares totales se trataron con sondas para tau agregada usando agregación de tau de Cisbio. Los datos son los datos recopilados de 4 réplicas biológicas independientes +/- SEM (error estándar de la media), normalizados para CC+B12 (tg4510).

20 Se sembraron células que expresaban P301L-htau con 40 µg de homogeneizado de cerebro Tg4510 (proteína total) preincubado durante una noche a 4 °C con anticuerpos (20 µg/ml ≈ 133 nM) por 6 pocillos. La siembra con CC+B12 dio una gran respuesta de siembra. hC10.2 tuvo un impacto sobre la agregación de aproximadamente un 40 %. Todos los demás anticuerpos mostraron un efecto al menos comparable al de hC10.2. En particular, las variantes N32S y N32S_A101T de hC10.2 mostraron efectos más fuertes con un 45 % y un 62 % de reducción en la tau agregada. La variante N32S_A101T mostró un efecto significativo más fuerte sobre la agregación en comparación con hC10.2. La figura demuestra que el C10.2 humanizado es eficaz para activar la siembra inducida por tau, pero la adición de N32S y, en particular, de la doble mutación N32S y A101T aumenta la actividad neutralizante del mAb.

25 **Figura 20. Estudios de desamidación de las variantes en condiciones de estrés** Como se realizó en el Ejemplo 8c, La desamidación de los restos de Asn en la posición 32 o 34 de la cadena VL se supervisó analizando el péptido tríptico LC:T2

30 [VTMTCQASQDTSIXLNWFQQKPGK; **SEQ ID NO: 58**] por LC-MS. X es Asn, Gln o Ser en las respectivas variantes indicadas en la Figura 20. El análisis de MS permite el cálculo del contenido relativo de péptido desamidado con respecto al no desamidado. En el WT, se observa una desamidación considerable en las variantes A101T y D55E en el péptido LC:T2. También es evidente que el cambio de Asn32 por Gln o Ser previene completamente la desamidación del péptido en los otros restos de Asn34. Además, no se detectó ninguna desamidación de las variantes de Gln32. Se observaron resultados similares con variantes de Asn34.

35 **Figura 21 Reducción de la siembra y agregación de tau en neuronas corticales por anticuerpos tau**

40 La siembra y agregación de tau en cultivos neuronales corticales de embriones de ratón rTg4510 se indujo con 0,2 ng de tau patológica de fracciones P3 o S1p de ratones rTg4510 de 40 semanas de edad y se midió mediante el ensayo de agregación de tau de Cisbio. A los 7 días en cultivo (DIV), las neuronas se trataron con una mezcla de P3 o S1p y 10 µg de anticuerpo o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se realizó un cambio de medio completo en DIV11 para eliminar las semillas de P3 y S1p y los anticuerpos residuales. Se permitió la siembra de tau durante 4 días más y las neuronas se lisaron en DIV15 para medir la siembra y agregación de tau. El PBS y el anticuerpo IgG de control humano (IgG con ab) no afectaron a la siembra y agregación de tau. La siembra y agregación de Tau se revertió parcialmente mediante el tratamiento con anticuerpos tau (hC10.2_A101T_N32S>hC10.2_N32S>hC10.2). Después se midió la reducción de la siembra y agregación de tau: 23 % con hC10.2, 41-53 % con hC10.2_N32S y 48-60 % con hC10.2_A101T_N32S. Los gráficos de barras representan datos de dos experimentos independientes de agregación de tau normalizados para la proteína neuronal como medias ± SD (desviación estándar). Prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples con ANOVA de un solo factor (PBS/IgG con ab vs hC10.2, hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S ***p<0,001; hC10.2 vs hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S ####p<0,001).

45 **Figura 22 Marcaje de estructuras tau dependiente de la dosis en ratones rTg4510 después de la inyección i.v. de hC10-2_N32S.**

50 hC10-2_N32S marca específicamente las estructuras diana *in vivo* en el hipocampo y la corteza en cerebros rTg4510. Se muestran imágenes de la corteza cingulada. Señales más fuertes a 20 y 80 mg/kg, señales débiles a 8 mg/kg, sin señal visible a 0,8 mg/kg.

Figura 23 Patología de tau sembrada en hipocampo

El número de células que tenían tinción de ovillos de Gallyas en el hipocampo sembrado se redujo mediante el tratamiento con hC10-2 (50 %), con hC10-2_N32S (48 %) y con hC10-2_N32S_A101T (47 %). La cuantificación se realizó en una de cada 6 secciones que cubren el hipocampo dorsal y en total se utilizaron 8 secciones por animal. El número de células refleja la suma de células positivas en todas las subregiones del hipocampo identificadas en las 8 secciones. Para analizar los datos se utilizó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con ANOVA de un solo factor.

SECUENCIAS INCORPORADAS POR REFERENCIA

5	SEQ ID NO: 1	Tau humana (2N4R)
10	SEQ ID NO: 2	restos 386-408 de tau (pS396, pS404)
	SEQ ID NO: 3	CDR1 de cadena ligera de C10-2
	SEQ ID NO: 4	CDR2 de cadena ligera de C10-2
	SEQ ID NO: 5	CDR3 de cadena ligera de C10-2
	SEQ ID NO: 6	CDR1 de cadena pesada de C10-2
15	SEQ ID NO: 7	CDR2 de cadena pesada de C10-2
	SEQ ID NO: 8	CDR3 de cadena pesada de C10-2
	SEQ ID NO: 9	Cadena ligera de C10-2 de ratón
	SEQ ID NO: 10	Cadena pesada de C10-2 de ratón
	SEQ ID NO: 11	Cadena pesada de C10-2 humanizado
20	SEQ ID NO: 12	Cadena ligera de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 13	Variante de cadena pesada D55E de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 14	Variante de cadena pesada D55Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 15	Variante de cadena pesada D55S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 16	Variante de cadena ligera N32S de C10-2 humanizado
25	SEQ ID NO: 17	Variante de cadena ligera N32Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 18	Variante de cadena ligera N34S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 19	Variante de cadena ligera N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 20	Variante de cadena ligera N32S, N34S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 21	Variante de cadena ligera N32Q, N34S de C10-2 humanizado
30	SEQ ID NO: 22	Variante de cadena ligera N32Q, N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 23	Variante de cadena ligera N32S, N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 24	Variante de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 25	Variante de cadena pesada D55E, A101T de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 26	Variante de cadena pesada D55Q, A101T de C10-2 humanizado
35	SEQ ID NO: 27	Variante de cadena pesada D55S, A101T de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 28	Variante de CDR2 de cadena pesada D55E de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 29	Variante de CDR2 de cadena pesada D55Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 30	Variante de CDR2 de cadena pesada D55S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 31	Variante de CDR1 de cadena ligera N32S de C10-2 humanizado

	SEQ ID NO: 32	Variante de CDR1 de cadena ligera N32Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 33	Variante de CDR1 de cadena ligera N34S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 34	Variante de CDR1 de cadena ligera N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 35	Variante de CDR1 de cadena ligera N32S, N34S de C10-2 humanizado
5	SEQ ID NO: 36	Variante de CDR1 de cadena ligera N32Q, N34S de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 37	Variante de CDR1 de cadena ligera N32Q, N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 38	Variante de CDR1 de cadena ligera N32S, N34Q de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 39	Variante de CDR3 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado
	SEQ ID NO: 40	CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
10	SEQ ID NO: 41	CDR2 de cadena ligera de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 42	CDR3 de cadena ligera de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 43	CDR1 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración IMGT
	SEQ ID NO: 44	CDR2 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración IMGT
	SEQ ID NO: 45	CDR3 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
15	SEQ ID NO: 46	Variante de CDR1 de cadena ligera N32S de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 47	Variante de CDR2 de cadena ligera de C10-2 humanizado N32S con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 48	Variante de CDR3 de cadena ligera de C10-2 humanizado N32S con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 49	Variante de CDR1 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 50	Variante de CDR2 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
20	SEQ ID NO: 51	Variante de CDR3 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de IMGT
	SEQ ID NO: 52	CDR1 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración de Chotia
	SEQ ID NO: 53	CDR2 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración de Chotia
	SEQ ID NO: 54	CDR3 de cadena pesada de C10-2 humanizado con numeración de Chotia
	SEQ ID NO: 55	Variante de CDR1 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de Chotia
25	SEQ ID NO: 56	Variante de CDR2 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de Chotia
	SEQ ID NO: 57	Variante de CDR3 de cadena pesada A101T de C10-2 humanizado con numeración de Chotia

Descripción detallada de la invención

Como se emplea en esta memoria, el término "tau" es sinónimo de "la proteína tau" y se refiere a cualquiera de las isoformas de la proteína tau (identificadas, p. ej., en UniProt como P10636, 1-9). La numeración de aminoácidos de tau que se usa en la presente memoria toma como referencia la isoforma 2 (**SEQ ID NO: 1**) como se muestra más adelante, siendo la metionina (M) el resto de aminoácido 1:

SEQ ID NO: 1

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGLTD AGLKESPLQT
 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG
 TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
 IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
 GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
 PDLKNVKSXI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
 PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
 QSKIGSLDNI THVPGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
 GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

- La presente invención está definida por las reivindicaciones. La descripción que comprende la invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos que son capaces de unirse específicamente a tau y, en particular, a tau humana y, en una realización, muestran la capacidad de unirse específicamente al resto S396 fosforilado (pS396) de tau humana. Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos de la descripción se caracterizan además por ser incapaces o sustancialmente incapaces de unirse específicamente al resto de serina 404 fosforilado (pS404) presente en la tau humana, p. ej., en condiciones limitadas o no saturantes de anticuerpos. Además, la fosforilación en pS404 no interfiere con la unión específica a epítopos que contienen pS396. Como se emplean en esta memoria, las notaciones "pS" y "^(p)S" indican el resto de aminoácido fososerina y los números posteriores identifican la posición del resto con respecto a la secuencia de **SEQ ID NO: 1**). Como se emplea en esta memoria, un anticuerpo es "sustancialmente" incapaz de unirse a un epítopo si, con respecto a otro epítopo, dicha unión es menos del 20 %, menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 2 % y, más preferiblemente, menos del 1 % de la unión observada con dicho otro epítopo.
- El término "anticuerpo" (Ac) en el contexto de la presente descripción se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse específicamente a un epítopo de una molécula ("antígeno"). Los anticuerpos de origen natural comprenden normalmente un tetrámero que generalmente está compuesto por al menos dos cadenas pesadas (HC) y al menos dos cadenas ligeras (LC). Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (abreviado en la presente memoria como VH) y un dominio constante de cadena pesada, generalmente compuesto por tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Las cadenas pesadas humanas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (abreviado en la presente memoria como VL) y un dominio constante de cadena ligera (CL). Las cadenas ligeras humanas incluyen cadenas kappa y cadenas lambda. El dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras normalmente es responsable del reconocimiento de antígenos, mientras que el dominio constante de las cadenas pesadas y ligeras puede intervenir en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Los dominios VH y VL se pueden subdividir además en dominios de hipervariabilidad, que reciben el nombre de "regiones determinantes de complementariedad", que están intercalados con dominios de secuencia más conservada, denominados "regiones marco" (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres dominios de CDR y cuatro dominios de FR dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Son de particular relevancia los anticuerpos y sus fragmentos de unión a epítopo que se han "aislado" de manera que existen en un medio físico distinto de aquél en el que pueden existir de forma natural o que se han modificado para que sean diferentes de un anticuerpo de origen natural o sus fragmentos de unión a epítopo en la secuencia de aminoácidos.
- El término "epítopo" significa un determinante antigenético capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos generalmente consisten en agrupamientos en la superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y lineales se distinguen por la característica de que la unión al primero, pero no al último, siempre se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítopo puede comprender restos de aminoácido directamente implicados en la unión y otros restos de aminoácido que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácido que se bloquean eficazmente por el péptido que se une específicamente al epítopo (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la señal característica del péptido que se une específicamente al epítopo).
- Como se emplea en esta memoria, la expresión "fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo" significa un fragmento, porción, región o dominio de un anticuerpo (independientemente de cómo se produzca (p. ej., mediante escisión, recombinación, síntesis, etc.) que es capaz de unirse específicamente a un epítopo. Un fragmento de unión a epítopo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios de CDR de dicho anticuerpo y, aunque es capaz de unirse específicamente a dicho epítopo, puede presentar una especificidad, afinidad o selectividad por dicho epítopo que difiere de la de dicho anticuerpo. Preferiblemente, sin embargo, un fragmento de unión a epítopo contendrá los 6

dominios de CDR de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo puede ser parte de, o comprender, una sola cadena polipeptídica (p. ej., un scFv), o puede ser parte de, o comprender, dos o más cadenas polipeptídicas, teniendo cada una un extremo amino y un extremo carboxilo (p. ej., un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento Fab₂, etc.). Se pueden obtener fragmentos de anticuerpos que presentan capacidad de unión a epítopos, 5 por ejemplo, por escisión con proteasa de anticuerpos intactos. Más preferiblemente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican de manera natural por genes separados, o los polinucleótidos que codifican tales secuencias de genes (p. ej., su ADNc codificante) se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, a través de un enlazador flexible que permite que se obtengan como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH están 10 asociadas para formar moléculas monovalentes de unión a epítopos (conocidas como Fv monocatenarias (scFv); véanse, p. ej., Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:5879-5883). Como alternativa, mediante el empleo de un enlazador flexible que es demasiado corto (p. ej., de menos de 15 aproximadamente 9 restos) para permitir que los dominios VL y VH de una única cadena polipeptídica se asocien entre sí, se puede formar un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar (en la que dos de estas cadenas polipeptídicas se asocian para formar una molécula de unión a epítopo bivalente) (véase, por ejemplo, en *PNAS USA* 90 (14), 6444-8 (1993) una descripción de los diacuerpos).

Los ejemplos de fragmentos de unión a epítopo incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')2, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en el dominio bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en dominios VL y VH, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y también se denomina anticuerpo de dominio (Holt *et al.*; *Trends Biotechnol.* Noviembre de 2003; 21(II): 484-90); (vi) anticuerpos de camélido o nanocuerpos (Revets *et al.*; *Expert Opin Biol Ther.* Enero de 2005; 5 (I): 1-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden 20 unirse, utilizando métodos recombinantes, a través de un enlazador sintético que les permite obtenerse como una única cadena de proteína en la que los dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al.*, *Science* 242, 423-426 (1988) y Huston *et al.*, *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)). Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles 25 se analizan con más detalle en la presente memoria. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos químéricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a epítopo) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como la escisión enzimática, la síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo tal como se genera puede 30 tener cualquier isotipo. Como se emplea en esta memoria, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que se codifica por genes de dominio constante de cadena pesada. Dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia; los fragmentos adecuados capaces de unirse a un epítopo deseado se pueden cribar fácilmente para comprobar su 35 utilidad de la misma manera que un anticuerpo intacto. En una realización, la región Fc comprende una mutación que modula las funciones efectoras.

40 La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que contiene dos fragmentos de unión a epítopo independientes que se dirigen, cada uno, a dianas independientes. Estas dianas pueden ser epítopos presentes en diferentes proteínas o diferentes epítopos presentes en la misma diana. Pueden prepararse moléculas de anticuerpo biespecíficas usando cambios compensatorios de aminoácidos en los dominios constantes de las HC de las moléculas 45 de anticuerpo bivalente monoespecífico precursor. El anticuerpo heterodimérico resultante contiene un Fab aportado por dos anticuerpos monoespecíficos precursores diferentes. Los cambios de aminoácidos en el dominio Fc conducen a una mayor estabilidad del anticuerpo heterodimérico con biespecificidad que es estable en el tiempo. (Ridgway *et al.*, *Protein Engineering* 9, 617-621 (1996), Gunasekaran *et al.*, *JBC* 285, 19637-1(2010), Moore *et al.*, *MAbs* 3:6 546-557 (2011), Strop *et al.*, *JMB* 420, 204-219 (2012), Metz *et al.*, *Protein Engineering* 25:10 571-580 (2012), Labrijn *et al.*, *PNAS* 110:113, 5145 -5150 (2013), Spreiter Von Kreudenstein *et al.*, *MAbs* 5:5 646-654 (2013)). Los anticuerpos 50 biespecíficos también pueden incluir moléculas que se generan usando fusiones de scFv. Entonces, dos scFv monoespecíficos se unen de forma independiente a dominios Fc capaces de formar heterodímeros estables para generar una única molécula biespecífica (Mabry *et al.*, *PEDS* 23:3 115-127 (2010)). Las moléculas biespecíficas tienen capacidades de unión dobles.

55 Los términos "C10-2", "C10-2 humano", "hC10-2", "HC10-2", "hC10.2", "C10-2 Humanizado" y "C10-2 humanizado", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y se definen como anticuerpo C10-2. El término pretende indicar un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo del mismo que comprende, o consiste en, un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo que tiene:

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

5 El anticuerpo C10-2 es un anticuerpo humanizado que puede definirse como un anticuerpo que comprende la cadena pesada de **SEQ ID NO: 11**, la cadena ligera de **SEQ ID NO: 12**, o ambas. Una realización de la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que comprende la cadena pesada de **SEQ ID NO: 11** y la cadena ligera de **SEQ ID NO: 12**.

10 El término "mC10-2", como se emplea en esta memoria y en las Figuras, pretende indicar el anticuerpo C10-2 de ratón y está definido por las **SEQ ID. NO. 9 y 10**. El anticuerpo C10.2 de ratón se utiliza como anticuerpo de control y no forma parte de la invención.

15 Los términos "hC10-2_N32S" y "C10-2_N32S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 32 de N a S y se definen como anticuerpo N32S. Los términos "hC10-2_N32Q" y "C10-2_N32Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 32 de N a Q y se define como anticuerpo N32Q.

20 Los términos "hC10-2_N34S" y "C10-2_N34S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 34 de N a S y se define como anticuerpo N34S. Los términos "hC10-2_N34Q" y "C10-2_N34Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 34 de N a Q y se define como anticuerpo N34Q.

25 Los términos "hC10-2_N32S_N34S" y "C10-2_N32S_N34S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos mutaciones de los restos de aminoácido 32 y 34 de N a S y se definen como anticuerpo N32S, N34S. Los términos "hC10-2_N32Q_N34S" y "C10-2_N32Q_N34S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos mutaciones de los restos de aminoácido 32 y 34 de N a Q y de N a S, respectivamente, y se definen como anticuerpo N32Q, N34S.

30 Los términos "hC10-2_N32Q_N34Q" y "C10-2_N32Q_N34Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos mutaciones de los restos de aminoácido 32 y 34 de N a Q y se definen como anticuerpo N32Q, N34Q. Los términos "hC10-2_N32S_N34Q" y "C10-2_N32S_N34Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos mutaciones de los restos de aminoácido 32 y 34 de N a S y de N a Q, respectivamente, y se definen como anticuerpo N32S, N34Q.

35 Los términos "hC10-2_D55E" y "C10-2_D55E", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 55 de D a E y se definen como anticuerpo D55E. Los términos "hC10-2_D55Q" y "C10-2_D55Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 55 de D a Q y se definen como anticuerpo D55Q. Los términos "hC10-2_D55S" y "C10-2_D55S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 55 de D a S y se definen como anticuerpo D55S.

40 Los términos "hC10-2_A101T" y "C10-2_A101T", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 101 de A a T y se definen como anticuerpo A101T

45 Los términos "hC10-2_N32S_A101T", "C10-2_N32S_A101T", "hC10-2_A101T_N32S" y "C10-2_A101T_N32S", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 101 de A a T y en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 32 de N a S y se definen como anticuerpo N32S, A101T.

50 Los términos "hC10-2_N32Q_A101T", "C10-2_N32Q_A101T", "hC10-2_A101T_N32Q" y "C10-2_A101T_N32Q", como se emplean en esta memoria y en las Figuras, son sinónimos y son variantes del anticuerpo C10-2 en donde la cadena pesada ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 101 de A a T y en donde la cadena ligera ha mutado para comprender al menos la mutación del resto de aminoácido 32 de N a Q y se definen como anticuerpo N32Q, A101T.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se emplean en esta memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal convencional muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular. En determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal puede estar compuesto por más de un dominio Fab, aumentando así la especificidad por más de una diana. Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" no deben considerarse limitadas por ningún método de producción en particular (p. ej., recombinante, transgénico, hibridoma, etc.).

Los anticuerpos de la descripción y los fragmentos de unión a epítopo de los mismos preferiblemente estarán "humanizados", particularmente si se emplean con fines terapéuticos. El término "humanizado" se refiere a una molécula, generalmente preparada utilizando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a epítopo derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a epítopo puede comprender dominios variables de anticuerpos no humanos completos fusionados con dominios constantes humanos, o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR), o partes de las mismas, de tales dominios variables injertadas en regiones marco humanas apropiadas de dominios variables humanos. Los restos marco de tales moléculas humanizadas pueden ser de tipo silvestre (p. ej., completamente humanos) o pueden haberse modificado para contener una o más sustituciones de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo humano cuya secuencia ha servido como base para la humanización. La humanización reduce o elimina la probabilidad de que un dominio constante de la molécula actúe como inmunógeno en individuos humanos, pero sigue existiendo la posibilidad de una respuesta inmunitaria al dominio variable extraño (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Otro enfoque se centra no solo en proporcionar dominios constantes de origen humano, sino también en la modificación de los dominios variables para remodelarlos de manera que se parezcan el máximo posible a la forma humana. Se sabe que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que supuestamente proporcionan un armazón para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, los dominios variables se pueden "remodelarse" o "humanizarse" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se ha notificado por Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p 185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148: 1149-1154. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (p. ej., un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, a las que también se hace referencia como una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original. La capacidad de humanizar un anticuerpo es bien conocida (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.859.205; 6.407.213; 6.881.557).

Con el término "anticuerpo" XX" se pretende indicar un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo (p. ej., anticuerpo "C10-2"), que comprende o consiste en: (a) la cadena ligera y la cadena pesada, el dominio variable de cadena pesada o las CDR1-3 del dominio variable de cadena pesada tal como se definen por su respectiva SEQ ID NO, o (b) el dominio variable de cadena ligera y la cadena pesada, el dominio variable de cadena pesada o las CDR1-3 del dominio variable de cadena pesada tal como se definen por su respectiva SEQ ID NO, o (c) las CDR1-3 del dominio variable de cadena ligera, tal como se definen por su respectiva SEQ ID NO, y la cadena pesada, el dominio variable de cadena pesada o las CDR1-3 del dominio variable de cadena pesada tal como se definen por su respectiva SEQ ID NO. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo se define por su dominio variable de cadena pesada completo como se define por su SEQ ID NO y su dominio variable de cadena ligera como se define por su SEQ ID NO.

A menos que se especifique lo contrario en la presente memoria, la numeración de los restos de aminoácido en la región Fc o el dominio constante de un anticuerpo se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

En algunos anticuerpos, solo una parte de una CDR, en particular el subconjunto de restos de CDR necesarios para la unión, que se denominan SDR, son necesarios para conservar la unión en un anticuerpo humanizado. Los restos

de CDR que no contactan con el epítopo relevante y no están en los SDR pueden identificarse basándose en estudios previos. Por ejemplo, a menudo no son necesarios los restos Tyr Ser Gln Lys Phe Gln, que corresponden a los restos 60-65 de la HC de **SEQ ID NO. 11**, de las regiones CDR de Kabat (estos también se encuentran en la CDR2 de HC (**SEQ ID NO. 7**), que está fuera de los bucles hipervariables de Chotia (véase, Kabat *et al.* (1992) SEQUENCES OF 5 PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," *J. Mol. Biol.* 196: 901-917), mediante modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales, N.R. *et al.* (2004) "SDR Grafting 10 Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity," *Mol. Immunol.* 41: 863-872. En dichos anticuerpos humanizados, en posiciones en las que están ausentes uno o más restos de CDR del anticuerpo donante o en las que se omite una CDR del anticuerpo donante completa, el aminoácido que ocupa la 15 posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de estas sustituciones de aminoácidos del anticuerpo donante por aminoácidos del anticuerpo aceptor en las CDR a incluir refleja un equilibrio de consideraciones de competencia. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden provocar cambios de afinidad y preferiblemente se evitan reducciones significativas de la afinidad. Las posiciones de sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

Los anticuerpos también se caracterizan según el sistema de numeración de IMGT, que está bien definido en este campo. La longitud (en número de aminoácidos, es decir, en número de posiciones ocupadas) es un concepto crucial 20 y original de IMGT-ONTOLOGY (<http://www.imgt.org>). Las longitudes de CDR-IMGT caracterizan las REGIONES V de IG y TR de los genes de la línea germinal y los DOMINIOS V de los genes reordenados, ADNc y proteínas.

Los anticuerpos se pueden caracterizar, por ejemplo, de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia. <http://www.bioinf.org.uk/abs/> El esquema de numeración de Chothia es idéntico al esquema de Kabat, pero coloca las 25 inserciones en CDR-L1 y CDR-H1 en las posiciones definidas estructuralmente. El esquema de numeración de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucle estructurales. Esto significa que los restos topológicamente equivalentes en estos bucles obtienen la misma etiqueta (a diferencia de lo que ocurre en el esquema de Kabat).

El hecho de que una alteración de un solo aminoácido de un resto de CDR pueda ocasionar una pérdida de unión 30 funcional (Rudikoff, S. *et al.* (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79(6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias de CDR funcionales alternativas. En un método preferido para obtener tales CDR variantes, se mutageniza un polinucleótido 35 que codifica la CDR (por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mediante un método dirigido (p. ej., amplificación mediada por cadena de polimerasa con cebadores que codifican el locus mutado)) para producir una CDR que tiene un resto de aminoácido sustituido. Mediante la comparación de la identidad del resto relevante en la secuencia de CDR original (funcional) con la identidad de la secuencia de CDR variante sustituida (no funcional), se puede identificar 40 la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj para esa sustitución. El sistema BLOSUM proporciona una matriz de sustituciones de aminoácidos creada mediante el análisis de una base de datos de secuencias para alineamientos fiables (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," *Nature Biotech.* 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. En la actualidad, la base de datos BLOSUM más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). La **Tabla 1** 45 presenta las puntuaciones de sustitución de BLOSUM62.ijj (cuanto más alta es la puntuación, más conservativa es la sustitución y, por tanto, es más probable que la sustitución no afecte a la función). Si un fragmento de unión a epítopo que comprende la CDR resultante no se une a tau, por ejemplo, entonces la puntuación de sustitución de BLOSUM62.ijj se considera insuficientemente conservativa, y se selecciona y realiza una nueva sustitución candidata que tenga una puntuación de sustitución más alta. Por tanto, por ejemplo, si el resto original era glutamato (E) y el resto sustituto no funcional era histidina (H), entonces la puntuación de sustitución de BLOSUM62.ijj será 0, y se prefieren cambios más conservativos (tales como aspartato, asparagina, glutamina o lisina).

Tabla 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3

Tabla 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Por tanto, la descripción contempla el uso de mutagénesis aleatoria para identificar CDR mejoradas. Las sustituciones conservativas pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejados en una o más de las **Tablas 2, 3 o 4**:

Clases de restos de aminoácido para sustituciones conservativas:

Tabla 2	
Restos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Restos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

Clases alternativas de sustitución de restos de aminoácido conservativa:

Tabla 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Clasificaciones alternativas físicas y funcionales de restos de aminoácido:

Tabla 4	
Restos que contienen grupos de alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalquenilo	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos cargados negativamente	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente	H, K y R
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

- 5 Los agrupamientos de sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

También se pueden formular otros grupos de aminoácidos utilizando los principios descritos en, p. ej., Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2nd Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

- 10 Como alternativa, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos para aumentar (o disminuir) la afinidad de las CDR. Esta tecnología, denominada maduración de afinidad, emplea mutagénesis o "avance de CDR" y la reselección usa el antígeno diana o un fragmento de unión al epítopo antigenético del mismo para identificar anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o precursor (véase, p. ej., Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149: 3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos individuales da como resultado un repertorio semi-aleatorizado de mutaciones de aminoácidos.
- 15 Pueden construirse bibliotecas que consisten en un conjunto de clones variantes, cada uno de los cuales difiere por una única alteración de aminoácido en una única CDR y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto de CDR. Los mutantes con una afinidad de unión aumentada (o disminuida) por el antígeno se pueden cribar poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con el antígeno marcado. Se puede usar cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con afinidad aumentada o disminuida por el antígeno (p. ej., ELISA) (véase Wu *et al.* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994). Se puede usar el avance de CDR que aleatoriza la cadena ligera (véase, Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

- 20 Se describen métodos para conseguir dicha maduración de afinidad, p. ej., en: Krause, J.C. *et al.* (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB

5 *Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,"* Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes," J. Mol. Biol. 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," MAbs 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," Virology 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," J. Mol. Biol. 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," Mol. Immunol. 46(1):135-144; y Barderas, R. et al. (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034.

10 Por tanto, la secuencia de las variantes de CDR de los anticuerpos abarcados o sus fragmentos de unión a epítopo puede diferir de la secuencia de la CDR del anticuerpo precursor, de C10-2 y de las variantes de C10.2, mediante sustituciones; por ejemplo, la sustitución de 4 restos de aminoácido, 3 restos de aminoácido, 2 restos de aminoácido o 1 de los restos de aminoácido. Además, se prevé que los aminoácidos de las regiones CDR puedan sustituirse con sustituciones conservativas, tal como se definen en las 3 tablas anteriores. Por ejemplo, el resto ácido Asp puede sustituirse por Glu sin afectar sustancialmente a la característica de unión del anticuerpo.

15 20 Como se emplea en esta memoria, se dice que un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo del mismo se une "específicamente" a una región de otra molécula (es decir, un epítopo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, con más rapidez, con mayor duración y/o con mayor afinidad o avidez con ese epítopo que con epítopos alternativos. Al leer esta definición, también se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que se une específicamente a una primera diana puede no unirse o no unirse específica o preferentemente a una 25 segunda diana. Como se emplea en esta memoria, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado se refiere normalmente a la unión con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente 10^{-7} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menor, determinada mediante, por ejemplo, la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) en un instrumento BIAcore® 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno 30 predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La dimensión en la que la afinidad es menor depende de la KD del anticuerpo, de modo que cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es 35 muy específico), entonces, la dimensión en la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces.

El término "kd" (s⁻¹ o 1/s), como se emplea en esta memoria, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina valor koff.

40 El término "ka" (M⁻¹ x s⁻¹ o 1/Ms), como se emplea en esta memoria, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término "KD" (M), como se emplea en esta memoria, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la kd por la ka.

El término "KA" (M⁻¹ o 1/M), como se emplea en esta memoria, se refiere a la constante de asociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la ka por la kd.

45 45 En una realización, la descripción se refiere a un anticuerpo anti-tau, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que presenta una o más de las siguientes propiedades:

- (i) una incapacidad sustancial de unirse a tau no fosforilada;
- (ii) una incapacidad sustancial de unirse a tau que está fosforilada en S404 y no fosforilada en S396;
- (iii) la capacidad de unirse a tau fosforilada en S396;
- (iv) la capacidad de unirse a tau fosforilada tanto en S396 como en S404;
- (v) la capacidad de discriminar selectivamente entre los restos de tau fosforilados S396 y S404 de manera que sea sustancialmente incapaz de unirse al resto 404 fosforilado (pS404);
- (vi) la capacidad de unirse a tau hiperfosforilada de cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer;
- (vii) la capacidad de discriminar entre la proteína tau humana patológica y no patológica; y/o

- 5 (viii) la capacidad, cuando se usa, como se describe en la presente memoria, con extractos inmunoempobrecidos deficitarios en rTg4510 de ratones transgénicos, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforiladas de 64 kDa y 70 kDa en al menos un 90 %, sin reducir la banda de tau de 55 kDa en más de un 10 %; o que tiene la capacidad, cuando se usa, como se describe en la presente memoria, con extractos de cerebros post-mortem de seres humanos con EA, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforiladas fosforiladas en S396 en al menos un 90 %, sin reducir las bandas de tau no hiperfosforiladas en más de un 10 %.

La descripción se refiere además a un método para obtener anticuerpos de alta afinidad y alta especificidad, en donde el método comprende las etapas de:

- 10 (A) inyectar un inmunógeno en un mamífero, para inmunizar de ese modo a dicho mamífero;
- (B) repetir dicha inmunización de dicho mamífero dos o más veces;
- (C) seleccionar una muestra de suero de dicho mamífero inmunizado repetidamente para comprobar la presencia de los anticuerpos de alta especificidad y alta afinidad deseados, pero sustancialmente menos capaces de unirse a otra proteína; y
- 15 (D) recuperar dichos anticuerpos de alta especificidad y de alta afinidad.

Por lo tanto, la descripción se refiere a un anticuerpo de alta especificidad y de alta afinidad específico para tau hiperfosforilada patógena que comprende el resto S396 fosforilado. Dichos anticuerpos pueden generarse mediante la adaptación del método indicado anteriormente para generar anticuerpos de alta especificidad y de alta afinidad que comprende:

- 20 (A) inyectar un inmunógeno en un mamífero, comprendiendo dicho inmunógeno el péptido bifosforilado que comprende 18-40, tal como 18-30, tal como 20-30 restos de aminoácido consecutivos que comprenden TDHGAEIVYK^(p)SPVVSGDT^(p)SPRHL (**SEQ ID NO: 2**) que cubren los restos 386-410 de tau 2N4R, para inmunizar de ese modo a dicho mamífero;
- (B) repetir dicha inmunización de dicho mamífero dos o más veces;
- 25 (C) seleccionar una muestra de suero de dicho mamífero inmunizado repetidamente para comprobar la presencia de anticuerpos de alta especificidad y de alta afinidad capaces de unirse a tau hiperfosforilada patógena que comprende el resto S396 fosforilado, pero sustancialmente menos capaces de unirse a tau no patógena; y
- (D) recuperar dichos anticuerpos de alta especificidad y de alta afinidad.

30 Como se emplea en esta memoria, una "incapacidad sustancial" de unirse a una molécula de tau denota una diferencia mayor del 20 %, una diferencia mayor del 40 %, una diferencia mayor del 60 %, una diferencia mayor del 80 %, una diferencia mayor del 100 %, una diferencia mayor del 150 %, una diferencia más de 2 veces mayor, una diferencia más de 4 veces mayor, una diferencia más de 5 veces mayor o una diferencia más de 10 veces mayor en funcionalidad, con respecto a la unión detectable mediada por un anticuerpo de referencia.

35 Los términos "selectivo" e "inmunoselectivo", cuando se refieren a las capacidades de unión de un anticuerpo anti-tau con respecto a dos epítopos, pretende indicar que la unión observada en condiciones de saturación presenta al menos una diferencia del 80 %, al menos una diferencia del 95 % y, lo más preferiblemente, una diferencia del 100 % (es decir, sin unión detectable a un epítopo). Los términos "selectivo" e "inmunoselectivo", cuando se refieren a un anticuerpo tau, pretenden además significar que el anticuerpo se une a tau hiperfosforilada de cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer y es capaz de discriminar entre proteína tau humana patológica y no patológica.

40 Las expresiones "fracciones extraíbles con TBS (S1), extraíbles con alto contenido de sal/sarkosyl (S3) e insolubles en sarkosyl (P3)" se refieren a fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento bioquímico de tau descrito en la presente memoria.

La expresión "tau normal" se refiere a tau de cerebro normal que contiene 2-3 moles de fosfato por mol de proteína.

45 La expresión "tau hiperfosforilada" se refiere a una especie polifosforilada de tau consistente con un cambio de movilidad inducido por especies polianiónicas en transferencia de Western o a una especie de tau que tiene más de cinco, seis o siete sitios de serina, treonina o tirosina fosforilados.

La expresión "tau que tiene el resto 396 fosforilado" se refiere a tau hiperfosforilada en donde el resto de serina 396 está fosforilado.

50 La expresión "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transcromosomas o transgenes de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un

- transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce un anticuerpo anti-tau humano cuando se inmuniza con antígeno tau y/o células que expresan tau. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como ocurre en los ratones transgénicos, p. ej., ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCol2, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como ocurre en los ratones KM transgénicos como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transgénicos (denominados colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isótipos de anticuerpos monoclonales humanos contra un antígeno dado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) mediante la recombinación de V-D-J y el cambio de isótipo.
- El animal transgénico no humano también se puede utilizar para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifican dicho anticuerpo específico, p. ej., uniendo operativamente los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.
- El término "tratamiento" o "tratar", como se emplea en esta memoria, significa mejorar, ralentizar, atenuar o revertir el progreso o la gravedad de una enfermedad o trastorno, o mejorar, ralentizar, atenuar o revertir uno o más síntomas o efectos secundarios de dicha enfermedad o trastorno. Para los fines de esta invención, "tratamiento" o "tratar" significa además un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, donde los "resultados clínicos beneficiosos o deseados" incluyen, sin limitación, alivio de un síntoma, disminución de la extensión de un trastorno o enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) de una enfermedad o trastorno, retraso o ralentización de la progresión de una enfermedad o trastorno, mejora o paliación de una enfermedad o trastorno, y remisión de una enfermedad o trastorno, ya sea parcial o total.
- Una "cantidad eficaz", cuando se aplica a un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo de la invención, se refiere a una cantidad suficiente, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir un efecto biológico deseado o un resultado terapéutico deseado que incluye, sin limitación, los resultados clínicos. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se aplica a un anticuerpo o un fragmento de unión a epítopo del mismo, pretende indicar una cantidad del anticuerpo, o fragmento de unión al epítopo del mismo, que es suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, revertir, ralentizar, atenuar o retrasar la progresión de un trastorno o enfermedad, o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, la descripción proporciona la administración del anticuerpo, o fragmento de unión a epítopo del mismo, en combinaciones con otros compuestos. En tales casos, la "cantidad eficaz" es la cantidad de la combinación suficiente para provocar el efecto biológico deseado.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a epítopo del mismo puede variar según factores tales como la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo anti-tau, o fragmento de unión a epítopo del mismo, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o de la porción de anticuerpo.
- Tal como se ha indicado anteriormente, la descripción se refiere, en particular, a anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a epítopo de los mismos, y a un método completamente nuevo para producir tales moléculas (y, por lo tanto, de dichos fragmentos de unión a epítopo de las mismas). Esta capacidad del nuevo método para aislar anticuerpos monoclonales se ejemplifica en la presente memoria por su uso para aislar anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse específicamente al resto fosforilado de serina 396 (P-S396, pS396, ³²P-S396) de tau humana (**SEQ ID NO: 1**). Estos anticuerpos se caracterizan además por su capacidad de discriminar entre los restos fosforilados de serina 396 y serina 404 (P-S404, pS404) de modo que no se unen a la proteína tau con la serina 404 fosforilada a menos que la tau también esté fosforilada en el resto 396.
- Los anticuerpos de la descripción, o el fragmento de unión a epítopo de los mismos, se han generado y aislado mediante el uso de un nuevo método que favorece la selección de anticuerpos específicos para pS396. Además, mediante la aplicación de este procedimiento de selección de clones de anticuerpos tan estricto, se han obtenido anticuerpos que no solo son altamente específicos hacia S396, sino que también son altamente selectivos hacia el epítopo de pS396 fosforilada. Estos anticuerpos reconocen de forma única la tau de los cerebros con enfermedad de Alzheimer. El procedimiento de cribado asegura la identificación de anticuerpos que poseen una utilidad funcional y terapéutica.
- Se generaron anticuerpos contra el péptido bifosforilado: TDHGAEIVYK{p}SPVVSGDT{p}SPRHL (**SEQ ID NO: 2**) que cubría los restos 386-408 de tau 2N4R. Se inmunizaron ratones con el fosfopeptido. Una vez que se hubieron obtenido suficientes títulos de anticuerpos, se sacrificaron los ratones y se generaron hibridomas. Los hibridomas se cribaron usando transferencia puntual y ELISA MSD con tau patológica y no patológica humana inmovilizada. La capacidad para discriminar entre la proteína tau humana patológica y no patológica en transferencia puntual y transferencia de Western se utilizó para la selección de hibridomas. Se seleccionaron dieciséis clones, de los cuales se recuperaron cuatro clones de hibridoma que producían anticuerpos que presentaban capacidades extraordinarias para unirse al material de tau patológica humana.
- La unión específica a tau patológica y no patológica también se determinó mediante el aislamiento de tau de cerebros con EA humanos enfermos y no enfermos y la inmovilización de este material en placas ELISA MSD. (**Ejemplo 4**).

5 También se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a epítopo del mismo generado contra el péptido bifosforilado que comprende al menos 18, tal como al menos 20 restos de aminoácido consecutivos dentro de TDHGAEIVYK^(p)SPVVGDT^(p)SPRHL (**SEQ ID NO: 2**) que cubre los restos 386-410 de tau 2N4R. En este aspecto, el anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a epítopo del mismo normalmente se genera contra el péptido bifosforilado que comprende 18-40, tal como 18-30, tal como 20-30 restos de aminoácido consecutivos que comprenden TDHGAEIVYK^(p)SPVVGDT^(p)SPRHL (**SEQ ID NO: 2**) que cubre los restos 386-410 de tau 2N4R.

10 En la presente memoria se describe además un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, que tiene una especificidad por fosfoTau (pTau) procedente de pacientes enfermos con EA con respecto a controles sanos de la misma edad, de tal manera que dicho anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, tiene una diferencia de especificidad por fosfoTau (pTau) de pacientes enfermos con EA con respecto a la tau de controles sanos de edad similar más de 50 veces, tal como más de 100 veces mayor en especificidad por el material con EA en comparación con el material de control sano en un ensayo basado en ELISA para detectar fosfoTau (pTau) en homogeneizados de cerebro de sujetos con EA y de sujetos de control sanos, utilizando un MSD o ELISA en la 15 configuración 1 específico para fosfo y multímero como se describe en la presente memoria.

20 También se describe en la presente memoria un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, que tiene una especificidad por Tau procedente de enfermos con EA tal que dicho anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, tiene una diferencia de especificidad por EA con respecto a controles sanos de edad similar más de 50 veces, tal como más de 100 veces mayor en especificidad por el material con EA en comparación con el material de control sano en un ensayo basado en ELISA o MSD para detectar fosfoTau (pTau) en homogeneizados de cerebro de sujetos con EA y de sujetos de control sanos, utilizando un ELISA en la configuración 1 específico para fosfo y multímero.

25 El método MSD o ELISA en la configuración 1 comprende las etapas A) una captura de antígenos Tau humanos patológicos de cerebros con EA usando placas recubiertas con C10-2; B) incubación de antígenos Tau con concentraciones crecientes de anticuerpos específicos de pS396; y C) detección del antígeno Tau libre residual capturado por C10.2 inmovilizado usando anticuerpos anti-Tau humanos (totales) marcados con sulfo de MSD.

30 De manera más específica, la etapa A comprende: recubrimiento de placas MSD (normalmente durante una noche a 4 grados C) con anticuerpo C10-2, normalmente 0,5 µg/ml (anticuerpo de captura) en tampón de recubrimiento, bloqueo (normalmente 1 hora a temperatura ambiente) y lavado, normalmente 3 veces. La etapa B comprende: mezcla de muestras de lisado P3 (normalmente diluido 1:1000 = 2-4 µg/ml de proteína total) y/o S1(p) (normalmente diluido 1:300 = 20-40 ng/ml de proteína total) de EA (combinado de 3 pacientes) con concentraciones graduadas de anticuerpo específico del epítopo del péptido pS396 e incubación (normalmente 1 hora a temperatura ambiente). Las reacciones posteriormente se incuban durante 2 horas en placas preparadas en la etapa A. La etapa C comprende detectar Tau capturada con C10-2 utilizando anticuerpo tau humano marcado con sulfo (normalmente 1:50) de MSD 35 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se analizan en MSD SECTOR® S600. P3 de EA y S1(p) de EA se ensayan en una configuración similar.

40 Una realización adicional se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse específicamente al resto de serina fosforilado 396 de tau humana (**SEQ ID NO: 1**), que se ha producido o fabricado en una línea celular tal como una línea celular humana, una línea celular de mamífero no humano, una línea celular de insecto, levadura o bacteriana.

45 El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse específicamente al resto fosforilado 396 de tau humana (**SEQ ID NO: 1**), puede producirse en una línea celular CHO, línea celular HEK, línea celular BHK-21, línea celular murina (tal como una línea celular de mieloma), línea celular de fibrosarcoma, línea celular PER.C6, línea celular HKB-11, línea celular CAP y línea celular humana HuH-7.

50 Las afinidades específicas y las propiedades de unión de C10-2 y las variantes de C10.2 se han caracterizado usando péptidos tau 386-410 (2R4N) que están fosforilados o no fosforilados en la posición 396 o 404. El uso del protocolo específico de inmunización y cribado resumido en esta solicitud producirá anticuerpos altamente específicos de fosfo-serina-396 (pS396).

55 Para demostrar que los anticuerpos son específicos por la tau patológica, también se han caracterizado anticuerpos C10-2 por análisis inmunohistoquímico. Los anticuerpos presentan una unión altamente específica a ovillos neurofibrilares en cerebros con enfermedad de Alzheimer (ovillos de tau) y en secciones de ratones transgénicos para tau Tg4510 que expresan tau mutante humana (P301L). No se observa unión al tejido procedente de cerebros humanos de control y de cerebros de ratones no transgénicos, lo que demuestra que los anticuerpos se unen específicamente a la tau humana y, en particular, a la tau asociada con la patología de Alzheimer.

55 Anticuerpo C10-2

En la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- 5 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

En la presente memoria se describe además un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- 10 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Como alternativa, utilizando la definición de IMGT, en la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 40**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 41**;
- 15 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 42**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 43**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 44**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 45**.

Como alternativa, usando la definición de Chotia, en la presente memoria se describe un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 52**;
- 25 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 53**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 54**.

Se demuestra la capacidad única de los anticuerpos de la descripción para reconocer la proteína tau asociada con la patología de la enfermedad. Se comparó la unión de tau patológica frente a no patológica. La comparación se realizó con cinco anticuerpos tau publicados: hACI-2B6, IPN002, HJ8.5, 2.10.3 y 4E4. El anticuerpo 2.10.3 es un anticuerpo monoclonal recombinante disponible comercialmente que se une específicamente a Tau que está fosforilada en la serina 422 (pS422). HJ8.5 es un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente que reconoce solo la tau humana en la región N-terminal (epítopo en los restos 25-30 aa). El anticuerpo es del isotipo IgG2b. El anticuerpo terapéutico anti-tau NI-105-4E4i es un anticuerpo disponible comercialmente. La tabla demuestra que los anticuerpos aislados presentan un grado excepcionalmente alto de especificidad y selectividad hacia la tau patológica humana. Esta selectividad es superior a la de cualquiera de los anticuerpos de comparación como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5		
mAb Ensayado	EA/ctrl	TG/wt
hACI-2B6	3	1
IPN002	3	37
HJ8.5	3	51
4E4	sin unión	1

2.10.3	5	2
Anticuerpo C10-2	>100	118

En la saturación, el anticuerpo C10-2 presenta una selectividad más de 100 veces mayor por la tau P3 aislada de cerebros humanos con EA.

Para demostrar que los anticuerpos seleccionados tienen utilidad funcional y terapéutica, los anticuerpos se ensayaron en ensayos de agregación de tau *in vitro* y en células. (Ejemplo 8). Estos ensayos son ensayos funcionales que demuestran que los anticuerpos pueden interferir con el proceso de agregación patológica de tau. Se transfectan células HEK293 de manera transitoria con tau-P301L-FLAG humana (4R0N). Posteriormente, las células se exponen a extractos de tau de cerebros humanos con EA o de cerebros Tg4510 transgénicos. Esta exposición a tau patológica promueve la captación de tau en las células y la agregación intracelular. Tanto el inmunoempobrecimiento de las preparaciones de tau utilizando el anticuerpo C10-2 como el tratamiento directo de las células con estos anticuerpos pueden reducir drásticamente la formación de agregados de tau.

También se ha evaluado la utilidad terapéutica del anticuerpo C10-2 en el ratón tau humana/PS1. Este modelo de ratón es un modelo animal más relevante para la EA que solo genera patología de EA en etapas avanzadas de la vida (12-18 meses de edad). Sin embargo, los ratones presentan hiperfosforilación de tau antes de la aparición de patología de ovillos sólidos. Los ratones recibieron inyecciones de forma crónica durante 13 semanas, dos veces por semana, con dosis de 15 mg/kg. Los ratones tratados con anticuerpos mostraron una reducción drástica de tau fosforilada, lo que indica que el tratamiento crónico con C10-2 reducirá la patología de los ovillos y, por lo tanto, la neurodegeneración posterior *in vivo*.

Los anticuerpos de la descripción eliminan específicamente la tau hiperfosforilada de extractos de cerebro de ratón rTg4510 mediante métodos de inmunoempobrecimiento. Además, los anticuerpos de la descripción no eliminan la tau normal de los homogeneizados, mientras que el anticuerpo tau5 disponible comercialmente lo hace. A diferencia de lo que ocurre con los anticuerpos comerciales que se unen a proteínas tau en donde la fosforilación está en el resto 404 o tanto en el resto 404 como en el 396, los anticuerpos de la descripción eliminan específicamente la tau hiperfosforilada que está fosforilada en la serina 396 en un 95 %. Los experimentos (Ejemplo 7) demuestran que el anticuerpo de la descripción, a pesar de eliminar solo una fracción muy pequeña de la tau total en el homogeneizado de cerebro (8 %), elimina específicamente la tau hiperfosforilada (en un 90 %).

Por consiguiente, un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, capaz de unirse específicamente a la tau hiperfosforilada patógena. Además, en experimentos en donde se eliminó tau hiperfosforilada usando un anticuerpo de la descripción, se suprimió la actividad de siembra. Al eliminar la tau hiperfosforilada de los homogeneizados, los homogeneizados ya no inducen la siembra de la patología Tau. Se ha propuesto que la reducción de la siembra reduce el desarrollo de la formación de ovillos y la progresión de tauopatías, entre las que se incluye la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para su uso en la reducción de la progresión de la EA o de los síntomas de la EA.

35 Anticuerpo D55E

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo D55E. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28** y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

45 Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**;
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 13**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - 5 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y además comprende
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28** y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

10 Anticuerpo D55Q

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo D55Q. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- 15 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 29**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

20 Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 14**.

25 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y además comprende

- 30
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 29**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo D55S

35 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo D55S. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 40 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 30**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 5 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12** y
 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 15**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- 10 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y además comprende
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 30**; y
- 15 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Los estudios realizados con el anticuerpo D55S, el anticuerpo D55Q y el anticuerpo D55E indican que la mutación de este resto da como resultado un anticuerpo con propiedades de unión inalteradas en comparación con dichos anticuerpos antes y después del tratamiento con pH bajo durante un período prolongado de tiempo a temperatura ambiente, lo que indica que no se produce isomerización a pH bajo o que cualquier proteína isomerizada tiene propiedades de unión inalteradas en comparación con la situación previa al tratamiento.

Anticuerpo N32S

La invención se refiere a la variante de anticuerpo del anticuerpo C10-2 denominada anticuerpo N32S. Este anticuerpo monoclonal comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;
- 25 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**; y comprende
- 30 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y
 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Una definición alternativa del anticuerpo N32S, utilizando la definición de IMGT, es un anticuerpo monoclonal que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 46**;
- 35 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 47**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 48**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 43**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 44**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 45**; y que comprende
- 40 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y

- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Una definición alternativa adicional del anticuerpo N32S, usando la definición de Chotia, es un anticuerpo monoclonal que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;

5 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 52**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 53**; y

10 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 54**; y que comprende (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Como se puede observar en la Figura 1, la CI50 del anticuerpo N32S (círculos negros) es menor que la del anticuerpo C10-2: se calculó que la CI50 de N32S era 44 nM. No se previó esta notable mejora con respecto al C10-2. Como se confirma por la Figura 1, un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo que inhibe AD-P3 en el ensayo de inhibición en fase fluida descrito en la presente memoria, de manera que la señal se reduce en un 50 % a una concentración de 100 nM o menor del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo de la invención tiene una CI50 de 0,1 nM a 100 nM, tal como una concentración de 50 nM o menor, tal como de 0,1 nM a 50 nM, basándose en el ensayo de inhibición en fase fluida para la captura de AD-P3.

20 Los datos generados usando el anticuerpo N32S indican que la mutación en la posición 32 de la cadena ligera del anticuerpo C10-2, o de la CDR1 de LC del anticuerpo C10-2, a serina da como resultado un aumento de la afinidad aparente (CI50) en los ensayos de inhibición de péptidos. Además, la mutación en la posición 32 a serina o glutamina (anticuerpo N32S y anticuerpo N32Q) anula la desamidación tanto en la posición 32 como en la posición 34 como se muestra en la Figura 20. Como se determina en términos de los estudios de siembra y agregación *in vitro*, en las variantes N32S y N32Q se mantiene la potencia.

25 El potencial de desamidación identificado en C10-2 en una posición que podría conducir a la heterogeneidad de los lotes de proteínas de C10-2 mostró unión heterogénea a antígenos AD-P3 con una fracción menor de alta afinidad aparente (2-5 nM) y una unión predominante con baja afinidad aparente (200-1000 nM) (Figura 1). La unión heterogénea podría reflejar diferentes subpoblaciones de C10-2 desamidado y no desamidado. Se generó una variante por sustitución (N32S) que impedía la desamidación. Como se muestra, mejoró la unión por actividad como se indica por el valor total de la CI50 reducido (mayor afinidad aparente) en comparación con C10-2. Se introdujo una sustitución adicional A101T que tuvo como resultado una unión homogénea de tipo de alta afinidad aparente. La actividad de unión mejorada tanto en N32S como en N32S-A101T sugiere que se consiguieron anticuerpos más estables y homogéneos mediante las mutaciones descritas anteriormente.

Anticuerpo N32Q

35 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo N32Q. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**;

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;

- 40 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y

- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 17**; y

- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - 5 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

10 Como se ha indicado, los datos generados con el anticuerpo N32S indican que la mutación en la posición 32 de la cadena ligera del anticuerpo C10-2, o de la CDR1 de la LC del anticuerpo C10-2 a serina da como resultado una mayor afinidad aparente (CI50), mientras que la mutación a glutamina (anticuerpo N32Q) da como resultado una actividad de unión inalterada. Sin embargo, la mutación en la posición 32 a serina o glutamina (anticuerpo N32S y anticuerpo N32Q) anula la desamidación tanto en la posición 32 como en la posición 34 como se muestra en la Figura 20. Por consiguiente, existen ventajas tanto con el anticuerpo N32S como con el anticuerpo N32Q. Como se determina en términos de los estudios de siembra y agregación *in vitro*, en las variantes N32S y N32Q se mantiene la potencia.

Anticuerpo N34S

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo N34S. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 33**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- 25 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 18**; y
- 30 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 33**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - 35 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo N34Q

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo N34Q. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que

comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 34**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 5 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 10 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 19**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 34**;
- 15 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- 20 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo N32S, N34S

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, el anticuerpo N32S, N34S. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 25 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 35**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- 30 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 20**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

- 35 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende
 - (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 35**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y que además comprende al menos uno de

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

5 Anticuerpo N32Q, N34S

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, el anticuerpo N32Q, N34S. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 36**;
- 10 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

15 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 21**;
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

20 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, N34S se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 36**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y que además comprende al menos uno de

- 25 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo N32Q, N34Q

30 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, el anticuerpo N32Q, N34Q. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 37**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 35 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**;

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 40 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 22**; y

- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 37**;

5 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y que además comprende al menos uno de

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y

10 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo N32S, N34Q

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, el anticuerpo N32S, N34Q. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

15 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 38**;

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y

20 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 23**; y

- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

25 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, N34Q se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 38**;

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

30 y que además comprende al menos uno de

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y

- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo A101T

35 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2 denominado anticuerpo A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;

40 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- 10 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y además comprende

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- 15 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Los datos generados usando el anticuerpo A101T indican que la mutación de la cadena pesada del anticuerpo C10-2 o de la CR3 de la cadena pesada del anticuerpo C10-2 da como resultado una unión al péptido dos veces mayor y una unión al material P3 10-20 veces mayor. Además, las variantes que comprenden la mutación A101T tienen una potencia aumentada en ensayos de siembra *in vitro*.

Anticuerpo N32S, A101T

La invención se refiere a la variante de anticuerpo del anticuerpo C10-2 denominada anticuerpo N32S, A101T. Este anticuerpo monoclonal comprende

- 25 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- 30 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**; y comprende (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

Utilizando la definición de IMGT, El anticuerpo N32S, A101T es un anticuerpo monoclonal, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 46**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 47**;
- 35 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 48**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 49**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 50**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 51**; y que comprende (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

Usando la definición de Chotia, El anticuerpo N32S, A101T es un anticuerpo monoclonal, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 55**;
- 5 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 56**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 57**; y que comprende (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; y (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

10 Como se puede observar en la Figura 1, la Cl50 del anticuerpo N32S, A101T (círculos blancos) se ha reducido drásticamente en comparación con el anticuerpo C10-2: se calculó que la Cl50 de N32S, A101T era 14 nM. No se previó esta notable mejora con respecto al C10-2. Basándose en la Figura 1, un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo que inhibe AD-P3 en el ensayo de inhibición en fase fluida descrito en la presente memoria, de manera que la señal se reduce en un 50 % a una concentración de 100 nM o menor del anticuerpo, tal como de 10 nM a 100 nM del anticuerpo, tal como una concentración de 50 nM o menor, tal como de 10 nM a 50 nM del anticuerpo. Como se muestra en la Figura 20, el anticuerpo N32S, A101 es muy estable frente a la desamidación. Como se muestra en la Figura 19, El anticuerpo N32S, A101T mostró una reducción más fuerte en la agregación.

15

Anticuerpo N32Q, A101T

20 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo N32Q, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- 25 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 17**; y
- 30 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**;

35 y que además comprende al menos uno de

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y que además comprende al menos uno de

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; y
- 40 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**.

Anticuerpo N32S, D55E

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo N32S, D55E. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- 5 (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**;
- 10 (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 13**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32S, D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 31**; y
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**;

15 y que además comprende al menos uno de

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; y
 - 20 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

Anticuerpo N32Q, D55E

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo N32Q, D55E. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**;
- 25 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

30 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 17**;
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 13**.

35 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N32Q, D55E se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 32**; y
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**;
- y que además comprende al menos uno de
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y

- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**.

5 Anticuerpo N34S, A101T

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo N34S, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 33**;
- 10 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

15 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34S, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 18**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

20 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34S, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 33**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**;

 y que además comprende al menos uno de

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- 25 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; y
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**.

Anticuerpo N34Q, A101T

30 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo N34Q, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 34**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- 35 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

40 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 19**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo N34Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 5 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 34**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**; y que además comprende al menos uno de
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 10 y que además comprende al menos uno de
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**.

Anticuerpo D55E, A101T

15 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo D55E, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
 - (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
 - (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- 20 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**; y
 - (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55E, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 25 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 25**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55E, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- 30 (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- y además comprende
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
 - (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 28**; y
- 35 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Anticuerpo D55Q, A101T

En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo D55Q, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- 40 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;

- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 29**; y
- 5 (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 26**.

10 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55Q, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

15 y además comprende

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 29**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Anticuerpo D55S, A101T

20 En la presente memoria se describe el anticuerpo variante del anticuerpo C10-2, Anticuerpo D55S, A101T. Este aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- 25 (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 30**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

30 Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55S, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 12**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 27**.

Como alternativa, una realización adicional del aspecto de la descripción dirigido al anticuerpo D55S, A101T se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, que comprende al menos uno de

35 (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;

(b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; y

(c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**;

y además comprende

- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 30**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 39**.

Se prevén combinaciones de las variantes de cadena pesada y variantes de cadena ligera, tales como múltiples variantes dentro de una cadena ligera y/o múltiples variantes dentro de una cadena pesada, una combinación de una variante singular dentro de una cadena ligera con una variante singular o múltiple dentro de una cadena pesada, y combinaciones de múltiples variantes dentro de una cadena ligera con múltiples variantes dentro de una cadena pesada. El anticuerpo preferiblemente comprende una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 12** (cadena ligera C10-2); **SEQ ID NO: 16** (variante de cadena ligera N32S); **SEQ ID NO: 17** (variante de cadena ligera N32Q); **SEQ ID NO: 18** (variante de cadena ligera N34S); **SEQ ID NO: 19** (variante de cadena ligera N34Q); **SEQ ID NO: 20** (variante de cadena ligera N32S, N34S); **SEQ ID NO: 21** (variante de cadena ligera N32Q, N34S); **SEQ ID NO: 22** (variante de cadena ligera N32Q, N34Q); y **SEQ ID NO: 23** (variante de cadena ligera N32S, N34Q); y

una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 11** (cadena pesada C10-2); **SEQ ID NO: 13** (variante de cadena pesada D55E); **SEQ ID NO: 14** (variante de cadena pesada D55Q); **SEQ ID NO: 15** (variante de cadena pesada D55S); **SEQ ID NO: 24** (variante de cadena pesada A101T); **SEQ ID NO: 25** (variante de cadena pesada D55E, A101T); **SEQ ID NO: 26** (Variante de cadena pesada D55Q, A101T) y **SEQ ID NO: 27** (variante de cadena pesada D55S, A101T).

En una realización, cuando la cadena ligera es la **SEQ ID NO: 12**, la cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 13** (variante de cadena pesada D55E); **SEQ ID NO: 14** (variante de cadena pesada D55Q); **SEQ ID NO: 15** (variante de cadena pesada D55S); **SEQ ID NO: 24** (variante de cadena pesada A101T); **SEQ ID NO: 25** (variante de cadena pesada D55E, A101T); **SEQ ID NO: 26** (Variante de cadena pesada D55Q, A101T) y **SEQ ID NO: 27** (variante de cadena pesada D55S, A101T). En una realización alternativa, cuando la cadena pesada es la **SEQ ID NO: 11**, la cadena ligera se selecciona del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 16** (variante de cadena ligera N32S); **SEQ ID NO: 17** (variante de cadena ligera N32Q); **SEQ ID NO: 18** (variante de cadena ligera N34S); **SEQ ID NO: 19** (variante de cadena ligera N34Q); **SEQ ID NO: 20** (variante de cadena ligera N32S, N34S); **SEQ ID NO: 21** (variante de cadena ligera N32Q, N34S); **SEQ ID NO: 22** (variante de cadena ligera N32Q, N34Q); y **SEQ ID NO: 23** (variante de cadena ligera N32S, N34Q).

El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, comprende idóneamente

(a) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 3**, **SEQ ID NO: 31**; **SEQ ID NO: 32**; **SEQ ID NO: 33**; **SEQ ID NO: 34**; **SEQ ID NO: 35**; **SEQ ID NO: 36**; **SEQ ID NO: 37**; y **SEQ ID NO: 38**; (b) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**; (c) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**; (d) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**; (e) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 7**; **SEQ ID NO: 28**; **SEQ ID NO: 29**; y **SEQ ID NO: 30**; y (f) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 8** y la **SEQ ID NO: 39**.

Las realizaciones interesantes de combinaciones de variantes incluyen aquellas en donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpo N32S, A101T; anticuerpo N32Q, A101T; anticuerpo N32S, D55E; y anticuerpo N32Q, D55E, preferiblemente anticuerpo N32S, A101T. Como se puede observar en los ejemplos, el anticuerpo N32S y el anticuerpo N32S, A101T son realizaciones preferidas.

En conjunto, los Ejemplos muestran que los anticuerpos de la descripción, incluyendo C10-2, se unen eficazmente a placas MSD recubiertas con antígenos AD-P3. Por el contrario, los anticuerpos comerciales tales como PHF-13, tienen una baja actividad de unión. Además, PHF-13 demostró un grado sustancialmente más alto de unión no específica en comparación con los anticuerpos de la descripción. La inhibición en fase fluida con C10-2 de la captura del antígeno Ptau en una placa recubierta con C10-2 es eficaz (CI50 = 10-20 nM) mientras que con PHF-13 es ineficaz (CI50 = 500-1000 nM).

En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 4**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 5**; y
- (d) una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 11**, **SEQ ID NO: 13**, **SEQ ID NO: 14**, **SEQ ID NO: 15**, **SEQ ID NO: 24**, **SEQ ID NO: 25**, **SEQ ID NO: 26** y **SEQ ID NO: 27**.

En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende

- (a) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 6**;

- (b) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 7**;
- (c) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 8**; y
- (d) una Cadena Ligera seleccionada del grupo que consiste en la **SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22** y **SEQ ID NO: 23**.

5 El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, normalmente inhibe AD-P3 en el ensayo de inhibición en fase fluida de modo que la señal se reduce en un 50 % a una concentración de 100 nM o menor del anticuerpo, tal como de 10 nM a 100 nM del anticuerpo, tal como una concentración de 50 nM o menor, tal como de 10 nM a 50 nM del anticuerpo. El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, normalmente, de acuerdo con la señal de transferencia de Western de tau pS396 después de estudios de inmunoenfoscopamiento en extractos de cerebro con enfermedad de Alzheimer, es capaz de eliminar al menos un 15 % de tau fosforilada en la serina 396 de homogeneizados de cerebro con EA a aproximadamente 75 ng de anticuerpo.

10 El anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado.

15 Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos mencionados anteriormente pueden, según una realización, comprender además una variante de tales CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena ligera y/o pesada (con no más de 4 diferencias de aminoácidos, o no más de 3 diferencias de aminoácidos, o no más de 2 diferencias de aminoácidos, o no más de 1 diferencia de aminoácidos).

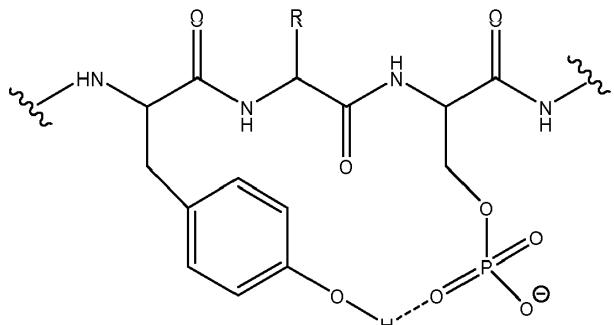
20 Como se puede observar en la **Figura 18**, la CDR1 de HC, la CDR2 de HC, la CDR3 de HC y la CDR3 de LC son, en al menos una realización, importantes para la unión a la región 392-398 de Tau. Se describe un anticuerpo, o fragmentos de unión a epítopo del mismo, que forma una cavidad hidrófoba formada por L3:H3, L3:F8*, H1:H13, H2:Y1, H2:Y3 con Y394 del péptido tau. Se describe un anticuerpo que compite con un anticuerpo que se describe con más detalle en la presente memoria por la formación de una red de enlaces de hidrógeno entre ¹⁰S396 solvatado y L3:T4, H1:R10, H1:T11, H3:R1, H3:T3; (*) L3:F8 es el resto del marco que flanquea el extremo C de CDR L3 (véase la **Figura 11**).

25 Como puede verse en la estructura cristalina por rayos X, el anticuerpo de la descripción se une con dos niveles de selectividad. El primer nivel de selectividad es la selectividad por tau patológica hiperfosforilada y el segundo nivel de selectividad es la selectividad por un resto de serina fosforilado en donde el fosfato de dicha serina fosforilada está unido a través de enlaces de hidrógeno a la cadena lateral de un resto de tirosina separado por un resto de dicha serina fosforilada. Por consiguiente, un aspecto interesante de la descripción se refiere a un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a epítopo del mismo, selectivo para un motivo de aminoácidos de tau hiperfosforilada, comprendiendo dicho motivo un resto de serina fosforilada y un resto de tirosina separados por un solo resto. Normalmente, el motivo de aminoácidos tiene la secuencia:

30 **Y - X - S(fosforilada) - P -**

35 en donde Y es tirosina, X es un aminoácido de origen natural, P es prolina y S(fosforilada) es serina con una cadena lateral hidroxilo fosforilada.

De manera similar, se describe un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que se une a tau fosforilada, preferiblemente a tau hiperfosforilada, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo es selectivo para el motivo de restos de aminoácido **IA**, en donde R es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural.

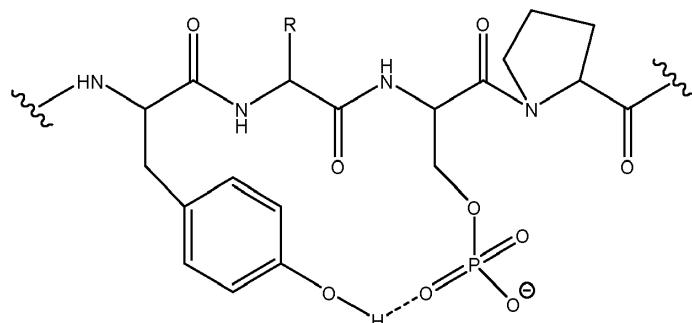


40 **IA**

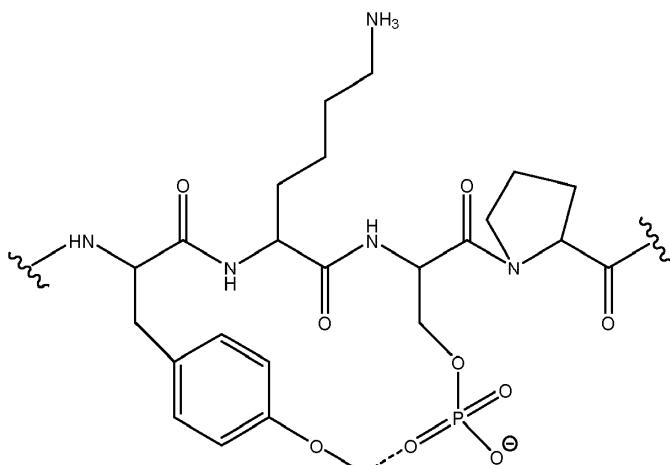
Sin quedar ligados a una teoría en particular, se cree que el anticuerpo es selectivo para el motivo de aminoácidos **IA** cuando dicho motivo está en una conformación adoptada por tau patológica. Por consiguiente, el motivo de aminoácidos **IA** normalmente es la secuencia reconocida selectivamente por el anticuerpo. Por consiguiente, se describe un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que se une a tau fosforilada, preferiblemente a tau

hiperfosforilada, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo es selectivo para el motivo de restos de aminoácido **IA**, en donde R es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural.

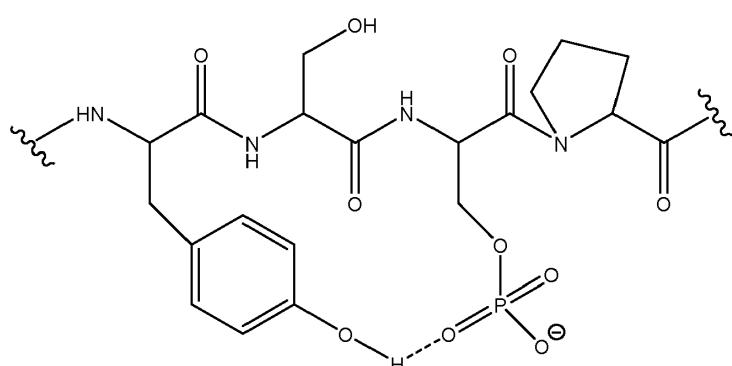
5 En una realización típica de este aspecto de la descripción, la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que se une a tau fosforilada, preferiblemente a tau hiperfosforilada, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo es selectivo para el motivo de restos de aminoácido **IB**, en donde R es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural tal como, pero sin limitación, **IC** o **ID**.



IB



16



ID

- 10 En un aspecto de la descripción, la región CDR1 de HC del anticuerpo, Asp Arg Thr Ile His (**SEQ. ID. NO. 7**) interacciona con los motivos **IA-ID** de tau hiperfosforilada.

Como se puede observar en la Figura 18, en este aspecto, la presencia de dos restos cargados consecutivos, particularmente el ácido aspártico y la arginina, en la CDR1 de HC interviene en la formación del enlace de hidrógeno con el motivo dentro del epítopo de tau diana en donde el anticuerpo es selectivo para un motivo de aminoácido de tau hiperfosforilada, comprendiendo dicho motivo un resto de serina fosforilado y un resto de tirosina separados por un solo resto. Por consiguiente, un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo que se une a tau fosforilada, preferiblemente a tau hiperfosforilada, en donde dicho anticuerpo o fragmento

de unión a epítopo del mismo es selectivo para el motivo de restos de aminoácido IA-ID, en donde el anticuerpo comprende una región CDR1 de HC que comprende dos restos de aminoácido cargados consecutivos, tales como ácido aspártico y arginina. En una alternativa adicional de este aspecto de la descripción, el anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo se une a tau hiperfosforilada, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo es un epítopo selectivo que comprende Serina 396 y Tirosina 394, en donde un grupo PO4 forma un enlace covalente con uno de dichos restos de serina 396 y tirosina 394 y un enlace de hidrógeno con el otro resto de serina 396 y tirosina 394, en donde el anticuerpo comprende regiones CDR1 de HC que comprenden dos restos cargados consecutivos, tales como ácido aspártico y arginina. Los restos de aminoácido cargados de la región CDR1 de HC pueden seleccionarse del grupo que consiste en arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico, en donde al menos uno de dichos restos es ácido aspártico o arginina, preferiblemente en donde un resto cargado es arginina y el otro es ácido aspártico.

En una realización adicional de este aspecto de la descripción, uno o los dos restos de aminoácido cargados consecutivos están flanqueados por un resto de aminoácido polar, preferiblemente seleccionado entre treonina y tirosina. Además, uno o los dos restos de aminoácido cargados consecutivos están flanqueados por un motivo de 3 restos de aminoácido de resto polar-resto hidrófobo-resto polar.

En una realización, la CDR1 de HC comprende el motivo de 5 restos AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - AA CARGADO - AA CARGADO, en donde al menos uno de dichos restos es ácido aspártico o arginina, preferiblemente en donde un resto cargado es arginina y el otro es ácido aspártico. Preferiblemente, el motivo de 5 restos tiene el motivo AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - Asp-Arg. Más preferiblemente, el motivo de 5 restos de la CDR1 de HC tiene la secuencia Thr-Phe-Thr-Asp-Arg.

Es interesante destacar que la CDR1 de HC del anticuerpo comprende el motivo POLAR-HIDRÓFOBO-POLAR-CARGADO a ambos lados de los dos restos de aminoácido cargados consecutivos implicados en el enlace de hidrógeno con el grupo fosfato implicado en la interacción electrostática entre S396 e Y394. Por consiguiente, en la realización preferida, la CDR1 de HC comprende el motivo palindrómico de 8 restos AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - AA CARGADO - AA CARGADO - AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR. Preferiblemente, el motivo de 8 restos de la CDR1 de HC comprende el motivo Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR. Más preferiblemente, el motivo de 8 restos de la CDR1 de HC comprende el motivo Thr-Phe-Thr-Asp-Arg-Thr-Ile-His.

En una realización, el anticuerpo reconoce un epítopo dentro de los restos 392-398 de tau hiperfosforilada que comprende Serina 396 y Tirosina 394 en donde la Serina 396 está fosforilada y en donde el anticuerpo comprende una región CDR1 de HC que comprende dos restos de aminoácido cargados consecutivos. En una realización preferida, el anticuerpo reconoce un epítopo dentro de los restos 392-398 de tau hiperfosforilada que comprende Serina 396 y Tirosina 394 en donde la Serina 396 está fosforilada y en donde el anticuerpo comprende una región CDR1 de HC que comprende el motivo de 5 restos AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - AA CARGADO - AA CARGADO. En una realización más preferida, el anticuerpo reconoce un epítopo dentro de los restos 392-398 de tau hiperfosforilada que comprende Serina 396 y Tirosina 394 en donde la Serina 396 está fosforilada y en donde el anticuerpo comprende una región CDR1 de HC que comprende el motivo AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR - AA CARGADO - AA CARGADO - AA POLAR - AA HIDRÓFOBO - AA POLAR.

En una realización preferida adicional, el anticuerpo comprende una región CDR1 de HC como se define en el presente documento y una región CDR3 de HC que comprende un motivo de 6 restos que comprende al menos dos restos cargados.

La presente invención también proporciona un método para reducir la formación de ovillos de tau en un paciente, que comprende administrar al paciente que necesite dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención, o fragmentos de unión a epítopo del mismo.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para tratar una tauopatía que utiliza un anticuerpo de la invención. Normalmente, la tauopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick, tauopatía primaria relacionada con la edad (PART, por sus siglas en inglés), demencia senil con predominio de ovillos neurofibrilares, demencia pugilística, encefalopatía traumática crónica, accidente cerebrovascular, recuperación de un accidente cerebrovascular, neurodegeneración en relación con la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo ligado a un cromosoma, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, parkinsonismo postencefalítico, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz y lipofuscinosis. Más habitualmente, la tauopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB) y enfermedad de Pick. En particular, las tauopatías pueden seleccionarse de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis debida a

EA o psicosis en pacientes con EA, y síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un anticuerpo de la invención, para su uso en el tratamiento de una tauopatía. Normalmente, la tauopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en

- 5 pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick, tauopatía primaria relacionada con la edad (PART, por sus siglas en inglés), demencia senil con predominio de ovillos neurofibrilares, demencia pugilística, encefalopatía traumática crónica, accidente cerebrovascular, recuperación de un accidente cerebrovascular, neurodegeneración en 10 relación con la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo ligado a un cromosoma, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, parkinsonismo postencefalítico, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz y lipofuscinosis. Más habitualmente, la tauopatía se 15 selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB) y enfermedad de Pick. En particular, las tauopatías pueden seleccionarse de la 20 enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, y síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy.

Se describe una terapia que comprende la administración de i) un anticuerpo Tau y ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- a) un inhibidor de BACE;
- 25 b) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con Tau;
- c) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con péptido A β ;
- d) un antagonista del receptor NMDA;
- e) otro inhibidor de la agregación de proteínas Tau;
- f) un inhibidor de acetilcolina esterase;
- 30 g) un fármaco antiinflamatorio; y
- h) un ISRS.

Se describe además una composición que comprende i) un anticuerpo Tau y ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

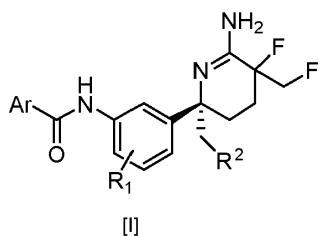
- 35 a) un inhibidor de BACE;
- b) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con Tau;
- c) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con péptido A β ;
- d) un antagonista del receptor NMDA;
- e) otro inhibidor de la agregación de proteínas Tau;
- 40 f) un inhibidor de acetilcolina esterase;
- g) un fármaco antiinflamatorio; y
- h) un ISRS.

45 Se describe además un kit que comprende i) una composición que comprende un anticuerpo Tau y ii) una composición que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- a) un inhibidor de BACE;

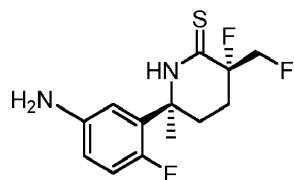
- b) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con Tau;
- c) un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con péptido A β ;
- d) un antagonista del receptor NMDA;
- e) otro inhibidor de la agregación de proteína Tau;
- 5 f) un inhibidor de acetilcolina esterasa;
- g) un antiepileptico;
- h) un fármaco antiinflamatorio; y
- i) un antidepresivo.
- a) Anticuerpo Tau combinado con un inhibidor de BACE 1
- 10 En la terapia, composición o kit, se puede combinar un anticuerpo tau con un inhibidor de BACE 1. El inhibidor de BACE1 puede ser un inhibidor de BACE I de molécula pequeña, tal como LY2886721, MK-8931, AZD3293 o E2609.

En una realización adicional, el inhibidor de BACE 1 es de fórmula I

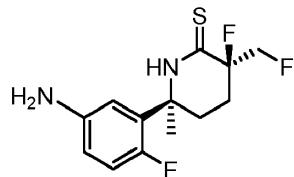


15 en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, y en donde Ar está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, CN, alquilo C1-C6, alquenilo C2-C6, alquinilo C2-C6, fluoroalquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; y R1 es uno o más hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C1-C3 o alquilo C1-C3; y R2 presenta hidrógeno o flúor.

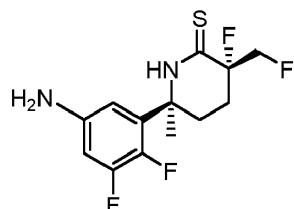
Los compuestos ejemplares de Fórmula I incluyen



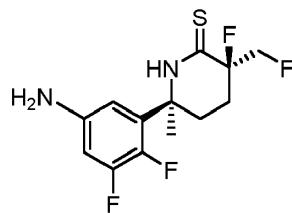
20 (3S,6S)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-3-fluoro-3-(fluoromethyl)-6-methylpiperidin-2-thione



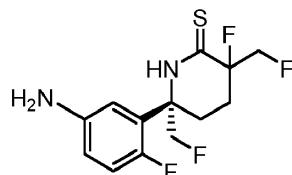
(3R,6S)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-3-fluoro-3-(fluoromethyl)-6-methylpiperidin-2-thione



(3S,6S)-6-(5-amino-2,3-difluorophenyl)-3-fluoro-3-(fluoromethyl)-6-methylpiperidin-2-thione

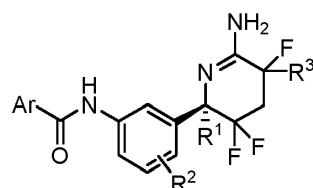


(3R,6S)-6-(5-amino-2,3-difluorophenyl)-3-fluoro-3-(fluoromethyl)-6-methylpiperidin-2-tiona



(6S)-6-(5-amino-2-fluorophenyl)-3-fluoro-3,6-bis(fluoromethyl)piperidin-2-tiona

- 5 Además, un inhibidor de BACE 1 adecuado puede ser de Fórmula II

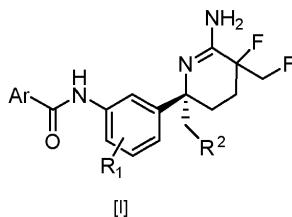


Fórmula II

en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, 1,2,4-triazolilo, tiofenilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, furazanilo y 1,2,4-tiadiazazolilo y donde el Ar está opcionalmente sustituido con uno o más halógeno, CN, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆; R¹ es alquilo C₁-C₃ o fluoroalquilo C₁-C₃; R² es hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃; y R³ es alquilo C₁-C₃.

Los compuestos ejemplares del inhibidor de BACE 1 de Fórmula II incluyen los compuestos seleccionados del grupo que consiste en: N-(3-((2R,5S)-6-amino-3,3,5-trifluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida; N-(3-((2R,5S)-6-amino-3,3,5-trifluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida; N-(3-((2R,5S)-6-amino-3,3,5-trifluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida; N-(3-((2R,5S)-6-amino-3,3,5-trifluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida; y N-(3-((2R,5R)-6-amino-3,3,5-trifluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida.

- 20 Se pueden seleccionar otros inhibidores de BACE de la siguiente fórmula



en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, y en donde Ar está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno, CN, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, fluoroalquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆; y

25 R¹ es uno o más hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C₁-C₃ o alquilo C₁-C₃;

R² presenta hidrógeno o flúor;

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

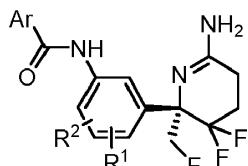
Por ejemplo, compuestos tales como

- 5 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida;
- 10 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida;
- 15 5 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida;
- 20 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida;
- 25 10 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida;
- 30 15 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida;
- 35 20 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-bromo-1-metil-1*H*-imidazol-2-carboxamida;
- 40 25 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida;
- 45 30 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida;
- 35 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-(difluorometil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida;
- 40 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida;
- 45 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-clorobenzamida;
- 50 *N*-(3-((2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida;
- 55 *N*-(3-((2*S,5R*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida;
- 60 *N*-[3-[(2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-3,4-dihidropiridin-2-il]-4,5-difluoro-fenil]-5-fluoro-piridin-2-carboxamida;
- 65 *N*-[3-[(2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-3,4-dihidropiridin-2-il]-4,5-difluoro-fenil]-5-metoxi-piridin-2-carboxamida;
- 70 *N*-[3-[(2*S,5R*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-3,4-dihidropiridin-2-il]-4,5-difluoro-fenil]-5-fluoro-piridin-2-carboxamida;
- 75 *N*-[3-[(2*S,5R*)-6-amino-5-fluoro-5-(fluorometil)-2-metil-3,4-dihidropiridin-2-il]-4,5-difluoro-fenil]-5-metoxi-piridin-2-carboxamida;
- 80 *N*-[3-[(2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-fluoro-piridin-2-carboxamida;
- 85 *N*-[3-[(2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-piridin-2-carboxamida;
- 90 *N*-[3-[(2*S,5S*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazin-2-carboxamida;
- 95 *N*-[3-[(2*S,5R*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-fluoro-piridin-2-carboxamida;
- 45 y *N*-[3-[(2*S,5R*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-piridin-2-carboxamida;

N-[3-[(2*S*,5*R*)-6-amino-5-fluoro-2,5-bis(fluorometil)-3,4-dihidropiridin-2-il]-4-fluorofenil]-5-metoxi-pirazin-2-carboxamida;

o una sal farmacéuticamente aceptable de dichos compuestos.

Otros inhibidores de BACE pueden tener la siguiente fórmula



5

Fórmula I

en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo e isoxazolilo, y cuando el Ar está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, CN, alquilo C1-C6, alquenilo C2-C6, alquinilo C2-C6, fluoroalquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; y

10 R1 y R2 son independientemente hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C1-C3 o alquilo C1-C3;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Por ejemplo, compuestos tales como

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida

15 (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-(difluorometil)-1*H*-pirazol-3-carboxamida

20 (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirimidina-2-carboxamida

25 (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida

30 (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-fluoropicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-cloropicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-cianopicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-metoxipicolinamida

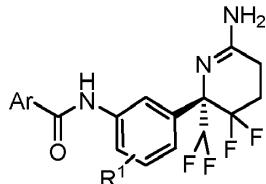
35 (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida (S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-bromopicolinamida

(S)-N-(3-(6-amino-3,3-difluoro-2-(fluorometil)-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-bromopicolinamida o una sal farmacéuticamente aceptable de dichos compuestos.

Otros compuestos BACE pueden ser de la siguiente fórmula



5

Fórmula I

en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, y donde el Ar está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno, CN, alquilo C1-C6, alquenilo C2-C6, alquinilo C2-C6, fluoroalquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; y

10 R1 es hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C1-C3 o alquilo C1-C3;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos pueden ser

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,

15 (S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,

20 (S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida,

25 (S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirimidina-2-carboxamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxi-3-metilpirazin-2-carboxamida,

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida,

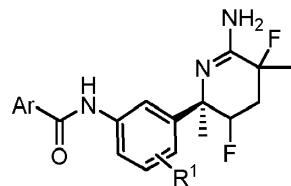
(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-bromopicolinamida,

30 (S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida y

(S)-N-(3-(6-amino-2-(difluorometil)-3,3-difluoro-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)pirazin-2-carboxamida;

o sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Otros inhibidores de BACE pueden tener la siguiente fórmula



en donde Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, imidazolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, y donde el Ar está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halógeno, CN, alquilo C1-C6, alquenilo C2-C6, alquinilo C2-C6, fluoroalquilo C1-C6 o alcoxi C1-C6; y

- 5 R1 es uno o más hidrógeno, halógeno, fluoroalquilo C1-C3 o alquilo C1-C3;
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El compuesto puede ser:

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,

10 N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-fluoropicolinamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipirazin-2-carboxamida,

15 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-metiloxazol-4-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-metoxipicolinamida,

19 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida,

20 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cloropicolinamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-metil-1H-imidazol-2-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(trifluorometil)pirazin-2-carboxamida,

25 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-metiltiazol-2-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-2-(difluorometil)oxazol-4-carboxamida,

30 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-1-(difluorometil)-1H-pirazol-3-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(difluorometil)pirazin-2-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-4-clorobenzamida,

N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-cianopicolinamida,

35 N-(3-((2R,3S,5R)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida,

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida,

40 N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)pirazin-2-carboxamida,

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-ciano-3-metilpicolinamida,

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4,5-difluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida,

5 N-(3-((2R,3R,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-(metoxi-d3)picolinamida,

N-(3-((2R,3S,5S)-6-amino-3,5-difluoro-2,5-dimetil-2,3,4,5-tetrahidropiridin-2-il)-4-fluorofenil)-5-bromopicolinamida o sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

b) Anticuerpo Tau combinado con un anticuerpo N3PGLU ABETA

10 En la terapia, composición o kit, un anticuerpo tau puede combinarse con un anticuerpo N3PGLU ABETA.

c) Anticuerpo tau combinado con un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con péptido A β

En la terapia, composición o kit, un anticuerpo tau puede combinarse con un compuesto útil en inmunoterapia activa o pasiva con péptido A β

d) Anticuerpo Tau combinado con un antagonista del receptor NMDA

15 En la terapia, composición o kit, se puede combinar un anticuerpo tau con un antagonista del receptor NMDA. El antagonista del receptor NMDA se puede seleccionar del grupo que consiste en, Memantina, Namenda, Namzaric (memantina/donepezilo) y formas genéricas de los mismos. El antagonista del receptor NMDA se puede seleccionar de un antipsicótico. Las neuronas presinápticas impiden la liberación excesiva de glutamato a través de mecanismos de retroalimentación negativa, pero estos mecanismos se ven comprometidos en condiciones de estrés celular, tales

20 como las que se producen en la EA. El exceso de glutamato en la hendidura sináptica hace que los canales de calcio postsinápticos estén continuamente abiertos, lo que conduce a un aumento de los niveles de calcio intracelular dentro de las neuronas, que produce daño neuronal severo y/o muerte. Al antagonizar el receptor NMDA en condiciones de entrada excesiva de calcio, el antipsicótico reduce la afluencia excesiva de calcio a las neuronas, disminuyendo el daño celular y mejorando la señalización neuronal normal y, por lo tanto, la función cognitiva.

25 e) Anticuerpo Tau combinado con otro inhibidor de la agregación de proteína Tau:

En la terapia, composición o kit, se puede combinar un anticuerpo tau con un inhibidor de la agregación de proteína Tau.

f) Anticuerpo Tau combinado con un inhibidor de acetilcolina esterase

30 En la terapia, composición o kit, se puede combinar un anticuerpo tau con un inhibidor de acetilcolina esterase (AChEI). Los AChEI se utilizan a menudo como tratamiento de primera línea para los síntomas cognitivos en la EA de leve a moderada. Los AChEI también se utilizan ampliamente para tratar la EA de moderada a grave, incluido el donepezilo, que está aprobado para esta subpoblación. Los AChEI alivian el déficit colinérgico observado en los pacientes con EA y mejoran la capacidad del paciente para realizar las actividades diarias. En la presente memoria se describe una terapia que comprende un anticuerpo tau como se define en la presente memoria y un inhibidor de acetilcolina esterase

35 En una realización, el AChEI se selecciona del grupo que consiste en donepezilo, galantamina y rivastigmina. El AChEI puede ser un comprimido oral, una gelatina, un jarabe u otra forma de formulación de solución oral. El AChEI también puede ser un parche para administración transdérmica.

g) Anticuerpo Tau combinado con un antiepileptico:

En la terapia, composición o kit, un anticuerpo tau puede combinarse con un antiepileptico.

40 h) Anticuerpo Tau combinado con un fármaco antiinflamatorio:

En la terapia, composición o kit, un anticuerpo tau puede combinarse con un fármaco antiinflamatorio.

i) Anticuerpo Tau combinado con un antidepresivo

En la terapia, composición o kit, un anticuerpo tau puede combinarse con un antidepresivo.

45 La depresión es un síntoma comórbido temprano común de la demencia asociada con la EA. Los antidepresivos tricíclicos alguna vez fueron el tratamiento preferido para los síntomas depresivos en la EA, pero los ISRS han reemplazado en gran medida a estos agentes. En una realización, el antidepresivo es el escitalopram, ya que se prescribe con frecuencia para la EA debido a su perfil favorable de efectos secundarios y a las interacciones farmacológicas mínimas. En una realización adicional, el antidepresivo es citalopram o sertralina ya que también se

utilizan con frecuencia. En una realización adicional, el antidepresivo es la vortioxetina, ya que se relaciona con la mejora en el rendimiento cognitivo y la evidencia por imágenes de la eficacia neuronal en pacientes que padecen TDM. El antidepresivo puede seleccionarse del grupo que consiste en Escitalopram, Sertralina, Citalopram, Paroxetina, Fluoxetina, Venlafaxina, Trazodona, Mirtazapina, Vortioxetina y formas genéricas de los mismos.

- 5 Se describe además un anticuerpo o fragmentos de unión a epítopo del mismo, en una composición junto con un vehículo, diluyente, adyuvante y/o estabilizador farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a epítopo de los mismos, puede usarse en terapia para el tratamiento de una tauopatía. Normalmente, la tauopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick, tauopatía primaria relacionada con la edad (PART, por sus siglas en inglés), demencia senil con predominio de ovillos neurofibrilares, demencia pugilística, encefalopatía traumática crónica, accidente cerebrovascular, recuperación de un accidente cerebrovascular, neurodegeneración en relación con la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo ligado a un cromosoma, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, parkinsonismo postencefalítico, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz y lipofuscinosis. Más habitualmente, la tauopatía se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB) y enfermedad de Pick. En particular, las tauopatías pueden seleccionarse de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, y síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy.

El tratamiento previsto puede ser crónico y el paciente puede ser tratado durante al menos 2 semanas, tal como al menos durante 1 mes, 6 meses, 1 año o más.

- 30 Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales producidos por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256, 495 (1975), o pueden ser anticuerpos monoclonales producidos mediante ADN recombinante u otros métodos o, más preferiblemente, pueden producirse mediante el nuevo método descrito. También pueden aislarse anticuerpos monoclonales de bibliotecas de presentación en fago de anticuerpos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature 352, 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de humanos inmunizados o de mamíferos no humanos tales como ratas, conejos, perros, ovejas, cabras, primates, etc.
- 40 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra tau usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente memoria como ratones HuMAb (anticuerpo monoclonal humano) y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos".
- 45 El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina humana no reordenadas de cadena variable y constante pesada (μ e Y) y de cadena variable y constante ligera (K), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y K (Lonberg, N. *et al.*, Nature 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o K de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos experimentan cambios de clase y mutación somática para generar IgG humana de alta afinidad, y anticuerpos monoclonales K (Lonberg, N. *et al.* (1994), supra; revisado en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. *et al.*, International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon *et al.*, J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. *et al.*, International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.
- 60 Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una alteración de JKD en sus genes de cadena ligera (kappa) endógena (como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 811-820 (1993)), una rotura de CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/14424), y un transgén de cadena

5 ligera kappa humana de KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)). Adicionalmente, los ratones HCo7 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el **Ejemplo 2** del documento WO 01/14424), los ratones HCo17 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el **Ejemplo 2** del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humana en un trasfondo homocigoto para la rotura de los loci de cadena ligera kappa y pesada de ratón endógenos.

10 En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en Chen *et al.*, *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF (SC20) del cromosoma 14 como se describe en el documento WO 02/43478. Se pueden generar 15 ratones HCo12-Balb/c, HCo17-Balb/c y HCo20-Balb/c cruzando HCo12, HCo17 y HCo20 con KCo5 [J/K](Balb) como se describe en el documento WO 09/097006.

20 El ratón rTg4510 es un modelo de tauopatía conocido que proporciona control temporal y espacial sobre la expresión del transgén de tau mutante. En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en Chen *et al.*, *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha alterado de forma homocigótica como se describe en el **Ejemplo 1** del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF (SC20) de unión a epítopo del cromosoma 14 como se describe en el documento WO 02/43478.

25 Pueden usarse esplenocitos de estos ratones transgénicos para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas. También pueden generarse de forma transgénica anticuerpos monoclonales o policlonales humanos, o anticuerpos que se originan a partir de otras especies, mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénica para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de dichas especies. En 30 relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos, y recuperarse, a partir de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690; US 5.756.687; US 5.750.172 y US 5.741.957).

35 El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Son isotipos ejemplares IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede utilizarse cualquiera de los dominios constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-tau puede cambiarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG. Además, se pueden utilizar técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos 40 se puede cambiar cambiando el isotipo a, p. ej., un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización, un anticuerpo es un anticuerpo IgG1, por ejemplo, una IgG1, κ. Se dice que un anticuerpo es de un isotipo particular si su secuencia de aminoácidos es la más homóloga a ese isotipo, con respecto a otros isotipos.

45 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente un anticuerpo IgG, en particular un anticuerpo IgG1, κ. En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de unión a epítopo de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario

50 Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos pueden obtenerse, p. ej., mediante fragmentación de unión a epítopo usando técnicas convencionales, y los fragmentos de unión a epítopo pueden cribarse en función de su utilidad como se describe en la presente memoria en relación con los anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ de unión a epítopo tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ de unión al epítopo resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab' de unión a epítopo. Pueden obtenerse fragmentos Fab de unión a epítopo tratando un anticuerpo IgG con papaína; también pueden obtenerse fragmentos Fab' de unión a epítopo con digestión con pepsina del anticuerpo IgG. También puede producirse un fragmento F(ab') de unión a epítopo uniendo Fab', como se describe a continuación, a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' de unión a epítopo es un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro del dominio bisagra del F(ab')₂. Un fragmento Fab' de unión a epítopo puede obtenerse tratando un fragmento F(ab')₂ de unión a epítopo con un agente reductor, tal como ditiotreitol. También puede generarse un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos de unión a epítopo en células recombinantes (véase, p. ej., Evans *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen químérico que codifica una porción de un fragmento F(ab')₂ de unión a epítopo podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y el dominio bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación de la traducción para producir dicha molécula de fragmento de unión a epítopo

de un anticuerpo truncado.

En una realización, el anticuerpo anti-tau es un anticuerpo monovalente, preferiblemente un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 que tiene una delección de la región bisagra. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, en donde dicho anticuerpo anti-tau se construye mediante un método que comprende: i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo anti-tau específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, y en donde, en el caso de un subtipo de IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de manera que la región CL no contiene ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG polyclonal humana o cuando se administra a un animal o un ser humano; ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región bisagra y, según lo requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tal como la región CH3, no comprendan ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG polyclonal humana o cuando se administran a un ser humano o animal, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidas operativamente entre sí; iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente; iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante la coexpresión de las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

De manera similar, en una realización, el anticuerpo anti-tau es un anticuerpo monovalente, que comprende:

- (i) un dominio variable de un anticuerpo de la invención como se describe en la presente memoria o una parte de unión a epítopo de dicho dominio, y
- (ii) un dominio CH de una inmunoglobulina o un dominio de la misma que comprende los dominios CH2 y CH3, en donde el dominio CH o el dominio del mismo se ha modificado de manera que el dominio correspondiente al dominio bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo de IgG4, otros dominios del dominio CH, tal como el dominio CH3, no comprenden restos de aminoácido que son capaces de formar enlaces disulfuro con un dominio CH idéntico u otros enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con un dominio CH idéntico en presencia de IgG polyclonal humana.

En una realización adicional, la cadena pesada del anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que se ha delecionado toda la región bisagra.

En otra realización adicional, la secuencia del anticuerpo monovalente se ha modificado de manera que no comprende ningún sitio aceptor para la N-glicosilación.

La descripción también incluye "anticuerpos biespecíficos", en donde una región de unión anti-tau (p. ej., una región de unión a tau de un anticuerpo monoclonal anti-tau) forma parte de un armazón biespecífico bivalente o polivalente que se dirige a más de un epítopo, (p. ej., un segundo epítopo podría comprender un epítopo de un receptor de transporte activo, de tal forma que el anticuerpo biespecífico presentaría una transcritosis mejorada a través de una barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica). Por tanto, en otra realización adicional, el Fab monovalente de un anticuerpo anti-tau puede unirse a un Fab o scfv adicional que se dirige a una proteína diferente para generar un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico puede tener una función doble, por ejemplo, una función terapéutica impartida por un dominio de unión anti-tau y una función de transporte que puede unirse a una molécula receptora para mejorar la transferencia a través de una barrera biológica, tal como la barrera hematoencefálica.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos, también incluyen anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios son péptidos en los que están conectados los dominios Fv de cadena ligera y pesada. En una realización, la presente invención proporciona un Fv monocatenario (scFv) en donde las cadenas pesada y ligera en el Fv de un anticuerpo anti-tau de la presente invención están unidas a través de un enlazador de péptido flexible (normalmente de aproximadamente 10, 12, 15 o más restos de aminoácido) en una sola cadena peptídica. Se describen métodos para producir tales anticuerpos, por ejemplo, en el documento US 4.946.778, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994), Bird *et al.*, Science 242, 423-426 (1988), Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty *et al.*, Nature 348, 552-554 (1990). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se utiliza una sola VH y VL, bivalente, si se utilizan dos VH y VL, o polivalente, si se utilizan más de dos VH y VL.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos descritos en la presente memoria pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de aminoácidos modificados y/o asociaciones con dichos sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto se determina generalmente por la capacidad de conservar al menos sustancialmente la selectividad de tau y/o la especificidad de tau asociada con el anticuerpo anti-tau precursor no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa para, por ejemplo, aumentar la semivida en suero del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad del polipéptido durante el almacenamiento. Los aminoácidos se modifican, por ejemplo, al mismo tiempo o después de la traducción durante la producción recombinante (p. ej., N-glicosilación en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (p. ej., farnesilado, geranil-geranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. La bibliografía está repleta de referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos. Pueden encontrarse protocolos ilustrativos en Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. El aminoácido modificado puede, por ejemplo, seleccionarse de un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico o un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.

Los anticuerpos, y fragmentos de unión a epítopo de los mismos, también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Se muestran polímeros ilustrativos y métodos para unirlos a péptidos, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106; US 4.179.337; US 4.495.285 y US 4.609.546. Otros polímeros ilustrativos incluyen polioles polioxetilados y polietilenglicol (PEG) (p. ej., un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, p. ej., de aproximadamente 3.000-12.000 g/mol).

Los anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo de los mismos pueden usarse además en un método de diagnóstico o como ligando de diagnóstico por imagen.

En una realización, se proporcionan anticuerpos y fragmentos de unión a epítopo que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo anti-tau radiomarcado se puede usar con fines diagnósticos y terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de tales marcadores incluyen, pero sin limitación, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{11}C , ^{13}C , ^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co , ^{60}Co), cobre (^{64}Cu), disprosio (^{165}Dy), erbio (^{169}Er), flúor (^{19}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), oro (^{198}Au), holmio (^{166}Ho), hidrógeno (^3H), indio (^{111}In , ^{112}In , ^{113}In , ^{115}In), yodo (^{121}I , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), iridio (^{192}Ir), hierro (^{59}Fe), criptón (^{81m}Kr), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), nitrógeno (^{13}N , ^{15}N), oxígeno (^{15}O), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), potasio (^{42}K), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rubidio (^{81}Rb , ^{82}Rb), rutenio (^{82}Ru , ^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), sodio (^{24}Na), estroncio (^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{92}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Yb), itrio (^{90}Y), cinc (^{65}Zn) y ciconio (^{89}Zr). El circonio (^{89}Zr) es particularmente interesante. Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2^a edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y documentos US 4.681.581; US 4.735.210; US 5.101.827; US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina T (Lindegren, S. *et al.* (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstanny)Benzoate As An Intermediate," *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. *et al.* (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor," *J. Med. Chem.* 36(9):1255-1261; Rea, D.W. *et al.* (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors," *Cancer Res.* 50 (3 Suppl): 857s-861s).

La descripción también proporciona anticuerpos anti-tau y fragmentos de unión a epítopo de los mismos que se marcan de forma detectable utilizando un marcador fluorescente (tal como un quelato de tierras raras (p. ej., un quelato de europio)), un marcador de tipo fluoresceína (p. ej., fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, diclorotriazinilamina fluoresceína), un marcador de tipo rodamina (p. ej., ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® o cloruro de dansilo), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), ficoeritrina; umbelifera, Lissamina; una cianina; una ficoeritrina, Rojo Texas, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) o un análogo de los mismos, todos los cuales son adecuados para detección óptica. Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (p. ej., luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también se pueden conseguir acoplando la molécula de diagnóstico a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, incluyendo dichas enzimas, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina.

Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (p. ej., luminol, luciferasa, luciferina y aequorina). Dicho diagnóstico y detección también se pueden conseguir acoplando la molécula de diagnóstico a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, incluyendo dichas enzimas, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. También se pueden emplear marcadores

paramagnéticos y preferiblemente se detectan usando tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Tales marcadores paramagnéticos incluyen, pero sin limitación, compuestos que contienen iones paramagnéticos de Aluminio (Al), Bario (Ba), Calcio (Ca), Cerio (Ce), Disprosio (Dy), Erbio (Er), Europio (Eu), Gandolinio (Gd), Holmio (Ho), Iridio (Ir), Litio (Li), Magnesio (Mg), Manganeseo (Mn), Molibdeno (M), Neodimio (Nd), Osmio (Os), Oxígeno (O), Paladio (Pd), Platino (Pt), Rodio (Rh), Rutenio (Ru), Samario (Sm), Sodio (Na), Estroncio (Sr), Terbio (Tb), Tulio (Tm), Estaño (Sn), Titanio (Ti), Tungsteno (W) y circonio (Zr) y, en particular, Co^{+2} , Cr^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Ga^{+3} , Mn^{+3} , Ni^{+2} , Ti^{+3} , V^{+3} y V^{+4} , metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Por tanto, en una realización, el anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo puede marcarse con un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático. El anticuerpo o fragmento marcado puede usarse para detectar o medir la presencia o cantidad de dicha tau en el cerebro de un sujeto. Este método puede comprender la detección o medición de imágenes *in vivo* de anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau unido a dicha tau y puede comprender imágenes *ex vivo* de dicho anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau unido a dicha tau.

15 Se describe además un vector de expresión que codifica una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de la descripción o un fragmento de unión a tau del mismo. Dichos vectores de expresión pueden usarse para la producción recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión a epítopo de los mismos.

20 Un vector de expresión puede ser cualquier vector de ADN o ARN adecuado, incluyendo vectores de ácido nucleico cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-tau está comprendido en un vector de ARN o ADN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector de plásmido tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe en, por ejemplo, Schakowski *et al.*, *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO_4 (como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler *et al.*, *Cell* 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

35 En una realización, el vector es adecuado para la expresión de anticuerpos anti-tau o fragmentos de unión a epítopo de los mismos en una célula bacteriana. Los ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares.

40 Un vector de expresión puede ser también o, como alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como el factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), Grant *et al.*, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987), Mattanovich, D. *et al.* *Methods Mol. Biol.* 824, 329-358 (2012), Celik, E. *et al.* *Biotechnol. Adv.* 30(5), 1108-1118 (2012), Li, P. *et al.* *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(2), 105-124 (2007), Boer, E. *et al.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(3), 513-523 (2007), van der Vaart, J.M. *Methods Mol. Biol.* 178, 359-366 (2002), y Holliger, P. *Methods Mol. Biol.* 178, 349-357 (2002)).

45 En un vector de expresión, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-tau pueden comprender o estar asociados con cualquier promotor adecuado, potenciador y otros elementos que facilitan la expresión. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., promotor/potenciador de IE de CMV humano, así como promotores de RSV, SV40, SL3-3, MMTV y LTR de VIH), secuencias de terminación poli(A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que tales términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

55 Se describe además una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo como se define en la presente memoria o una molécula biespecífica como se define en la presente memoria. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen levadura, bacterias y células de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente descripción proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-tau o un fragmento de unión a epítopo del mismo. En otra realización, la presente descripción proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia

que codifica la expresión de un anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a epítopo del mismo.

Se describe además un método para producir un anticuerpo anti-tau, comprendiendo dicho método las etapas de a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y b) purificar el anticuerpo del medio de cultivo.

5 Se describe una preparación que comprende un anticuerpo anti-tau como se define en la presente memoria y que está sustancialmente libre de anticuerpos de origen natural que no son capaces de unirse a tau o que no alteran materialmente la funcionalidad anti-tau de la preparación. Por tanto, tal preparación no incluye suero de origen natural, o un derivado purificado de dicho suero, que comprende una mezcla de un anticuerpo anti-tau y otro anticuerpo que no altera la funcionalidad del anticuerpo anti-tau de la preparación, en donde dicha funcionalidad es:

- 10 (i) una incapacidad sustancial de unirse a tau no fosforilada;
 (ii) una incapacidad sustancial de unirse a tau que está fosforilada en S404 y no fosforilada en S396;
 (iii) la capacidad de unirse a tau fosforilada en S396;
 (iv) la capacidad de unirse a tau fosforilada tanto en S396 como en S404;
 (v) la capacidad de discriminar selectivamente entre los restos de tau fosforilados S396 y S404 de manera que sea sustancialmente incapaz de unirse al resto 404 fosforilado;
 15 (vi) la capacidad de unirse a tau hiperfosforilada de cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer;
 (vii) la capacidad de discriminar entre la proteína tau humana patológica y no patológica; y/o
 (viii) la capacidad, cuando se usa, como se describe en la presente memoria, con extractos inmunoeimpobrecidos deficitarios en rTg4510 de ratones transgénicos, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforiladas de 64 kDa y 70 kDa en al menos un 90 %, sin reducir la banda tau de 55 kDa en más del 10 %, o la capacidad, cuando se usa como se describe en la presente memoria con extractos de cerebros post-mortem de seres humanos con EA, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforilada fosforilada S396 en al menos un 90 %, sin reducir las bandas de tau no hiperfosforiladas en más de un 10 %.

20 La descripción se refiere, en particular, a preparaciones de dicho anticuerpo anti-tau que tiene un cambio estructural en su secuencia de aminoácidos (en cualquiera de sus CDR, dominios variables, restos marco y/o dominios constantes) en relación con la estructura de un anticuerpo anti-tau de origen natural, en donde dicho cambio estructural hace que el anticuerpo anti-tau presente una funcionalidad marcadamente alterada (es decir, una diferencia mayor del 20 %, una diferencia mayor del 40 %, una diferencia mayor del 60 %, una diferencia mayor del 80 %, una diferencia mayor del 100 %, una diferencia mayor del 150 %, una diferencia más de 2 veces mayor, una diferencia más de 4 veces mayor, una diferencia más de 5 veces mayor o una diferencia más de 10 veces mayor en funcionalidad) con respecto a la funcionalidad presentada por dicho anticuerpo anti-tau de origen natural; en donde dicha funcionalidad es:

- 25 (i) una incapacidad sustancial de unirse a tau no fosforilada;
 (ii) una incapacidad sustancial de unirse a tau que está fosforilada en S404 y no fosforilada en S396;
 30 (iii) la capacidad de unirse a tau fosforilada en S396;
 (iv) la capacidad de unirse a tau fosforilada tanto en S396 como en S404;
 (v) la capacidad de discriminar selectivamente entre los restos de tau fosforilados S396 y S404 de manera que sea sustancialmente incapaz de unirse al resto 404 fosforilado;
 (vi) la capacidad de unirse a tau hiperfosforilada de cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer;
 35 (vii) la capacidad de discriminar entre la proteína tau humana patológica y no patológica; y/o
 (viii) la capacidad, cuando se usa, como se describe en la presente memoria, con extractos inmunoeimpobrecidos deficitarios en rTg4510 de ratones transgénicos, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforiladas de 64 kDa y 70 kDa en al menos un 90 %, sin reducir la banda de tau de 55 kDa en más de un 10 %; o que tiene la capacidad, cuando se usa, como se describe en la presente memoria, con extractos de cerebros post-mortem de seres humanos con EA, de reducir específicamente las bandas de tau hiperfosforiladas fosforiladas en S396 en al menos un 90 %, sin reducir las bandas de tau no hiperfosforiladas en más de un 10 %.

40 El término "sustancialmente libre" de anticuerpos de origen natural se refiere a la ausencia completa de dichos anticuerpos de origen natural en tales preparaciones, o de la inclusión de una concentración de dichos anticuerpos de origen natural en tales preparaciones que no afecta materialmente a las propiedades de unión a tau de las

preparaciones. Se dice que un anticuerpo está "aislado" si no tiene un homólogo de origen natural o si se ha separado o purificado de los componentes que lo acompañan de forma natural.

5 La expresión "anticuerpos de origen natural", en lo que respecta a dichas preparaciones, se refiere a anticuerpos (incluidos los autoanticuerpos que se producen de forma natural) producidos en seres humanos u otros animales vivos, como consecuencia natural del funcionamiento de su sistema inmunitario.

10 Por tanto, las preparaciones no excluyen, y de hecho abarcan explícitamente, las preparaciones que contienen un anticuerpo anti-tau y un anticuerpo adicional añadido deliberadamente capaz de unirse a un epítopo que no posee tau. Tales preparaciones incluyen, en particular, realizaciones de las mismas en donde la preparación presenta una eficacia mejorada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de granos argirofílicos (EGA),
 15 parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB). Además, la presente descripción se refiere a preparaciones que contienen anticuerpos anti-tau o fragmentos de unión a epítopo de los mismos, destinados a su uso en el tratamiento de psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, y síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy. Además, las preparaciones contienen anticuerpos anti-tau, o fragmentos de unión a epítopo de los mismos, que se pueden utilizar en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares, recuperación de un accidente cerebrovascular y neurodegeneración en relación con la enfermedad de Parkinson.

En otro aspecto adicional, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- 20 (i) un anticuerpo tau, o fragmento de unión a epítopo del mismo, ambos como se definen en la presente memoria, o una preparación, como se define este término en la presente memoria, que comprende dicho anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a epítopo del mismo; y
 25 (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22^a Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

30 Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, deben ser adecuados para el compuesto elegido y el modo de administración elegido. La idoneidad de los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la ausencia de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegidos (p. ej., un impacto menor que un impacto sustancial (10 % o menos de inhibición relativa, 5 % o menos de inhibición relativa, etc.)) sobre la unión del epítopo.

35 Una composición farmacéutica también puede incluir cargas diluyentes, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de tales diluyentes agua destilada, solución fisiológica salina tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos y no inmunogénicos y similares. Las composiciones también pueden incluir macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como el quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (p. ej., sefarosa funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (p. ej., gotitas de aceite o liposomas).

40 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, 45 composición y modo de administración particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la 50 condición, el estado de salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

55 La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados, que incluyen: medios parenterales, tópicos orales o intranasales para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. En una realización, una composición farmacéutica se administra por vía parenteral. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se emplean en esta memoria, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, generalmente por inyección, e incluyen infusión e inyección epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, subcapsular, subaracnoidea,

intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

En la técnica se conocen bien otras vías de administración adecuadas de un compuesto *in vivo* e *in vitro* y pueden seleccionarse por los expertos en la materia.

En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción adecuados, y similares, que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

10 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o diversos tampones. Otros vehículos son bien conocidos en la técnica farmacéutica.

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

20 Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, o mediante el uso de tensioactivos.

25 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

30 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

35 Las composiciones farmacéuticas también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica.

40 Los compuestos pueden prepararse con vehículos que protejan al compuesto contra una liberación rápida, tal como en una formulación de liberación controlada, incluidos los implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables biocompatibles tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

45 En una realización, los compuestos pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

50 Las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser normalmente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un medio de dispersión o disolvente acuoso o no acuoso que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede

conseguirse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción de anticuerpos, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej., como se ha enumerado anteriormente, según sea necesario, seguido de

5 microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, p. ej., de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son 10 ejemplos de métodos de preparación el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada y esterilizada del mismo.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los 15 enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son ejemplos de métodos de preparación el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada y esterilizada del mismo.

20 Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento anteriores y los usos descritos en la presente memoria se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una sola inyección en embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en forma farmacéutica unidosis para facilitar la administración y 25 uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unidosis, como se emplea en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas farmacéuticas unidosis viene dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea 30 lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Las dosis y los regímenes de dosificación eficaces para los anticuerpos o fragmentos de unión a epítopo de los mismos dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden determinarse por los expertos en la técnica. En cualquier día en que se administre una dosis, la dosis puede variar de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg y, 35 más habitualmente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal o pueden estar dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg de peso corporal. Por tanto, las dosis ilustrativas incluyen: de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 0,15 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,2 mg/kg/peso 40 corporal, aproximadamente 0,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal.

Un médico que tenga experiencia en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la 45 composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría empezar con dosis de un anticuerpo o fragmento de unión a epítopo del mismo empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser, p. ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Si se desea, la dosis diaria 50 eficaz de una composición farmacéutica se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unidosis. Aunque es posible administrar un compuesto solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

55 Los anticuerpos marcados o fragmentos de unión a epítopo de los mismos pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o supervisar enfermedades o trastornos. La descripción proporciona la detección o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo o cognitivo, que incluye, pero sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB), que comprende: (a) ensayar la existencia de fragmentos A β piroglutamados en células o muestras de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen específicamente a tau; y (b) 60 comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, p. ej., niveles en muestras de tejido normal, con lo que un aumento en el nivel de antígeno ensayado en comparación con el nivel de antígeno de control es indicativo de la enfermedad o trastorno, o es indicativo de la gravedad de la enfermedad o trastorno.

- Los anticuerpos o fragmentos de unión a epítopo de los mismos pueden usarse para ensayar la presencia de tau o fragmentos de tau en una muestra biológica usando métodos inmunohistoquímicos bien conocidos en la técnica. Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar proteínas incluyen inmunoensayos tales como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo de radioinmunoensayo (RIA) y ensayos basados en la plataforma de descubrimiento de mesoescala (MSD). Pueden usarse marcadores de anticuerpos adecuados en tales kits y métodos, y los marcadores conocidos en la técnica incluyen marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa; radioisótopos marcadores, tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^{3}H), indio (^{121}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); y marcadores luminiscentes, tales como luminol y luciferasa; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.
- 5 10 Puede detectarse la presencia de anticuerpos anti-tau marcados o sus fragmentos de unión a tau *in vivo* con fines de diagnóstico. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicha molécula marcada; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre en los sitios (si los hay) de deposición de A β y para permitir que la molécula marcada no unida se elimine hasta alcanzar el nivel de fondo; c) determinar un nivel de fondo; y d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de modo que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo es indicativa de que el sujeto tiene la enfermedad o trastorno, o es indicativa de la gravedad de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con tal realización, la molécula se marca con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección usando un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la técnica. Los niveles de fondo se pueden determinar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluida la comparación de la cantidad de anticuerpo marcado detectado con un valor estándar determinado previamente para un sistema de formación de imágenes en particular. Los métodos y sistemas que pueden usarse en los métodos de diagnóstico incluyen, pero sin limitación, tomografía computarizada (TC), exploración de todo el cuerpo, tal como tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), resonancia magnética (RM) y ecografía.
- 15 20 25 En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, como se define en la presente memoria para su uso en terapia.
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento, diagnóstico o imagenología de tauopatías.
- 30 35 En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB).
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a epítopo del mismo, como se define en la presente memoria para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, diagnóstico o imagenología de tauopatías.
- 40 45 Preferiblemente, el medicamento es para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de granos argirofílicos (EGA), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y degeneración corticobasal (DCB), lo más preferiblemente la enfermedad de Alzheimer (EA). El medicamento también es preferiblemente para el tratamiento de psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, y síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy.
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona un método de tratamiento, diagnóstico o imagenología de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar el medicamento, anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a epítopo del mismo como se define en la presente memoria, a dicho sujeto en una cantidad eficaz.
- En una realización preferida, el tratamiento es crónico, preferiblemente durante al menos 2 semanas, tal como al menos durante 1 mes, 6 meses, 1 año o más.
- En un aspecto adicional, la descripción proporciona un kit que comprende el anticuerpo, o fragmento del mismo, como se define en la presente memoria para su uso en terapia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunización de ratones con fosfopéptidos de tau 396/404

50 Se inmunizaron ratones C56/BL6 y FVB con 10 μg de péptido tau fosforilado 386-408 (pS396/pS404) conjugado con P30 (**SEQ ID NO: 2**) formulado en adyuvante TiterMax.

Los ratones (cepas C56/BL6 y FVB, hembras y machos de 2 a 3 meses de edad) se inmunizaron con tau 386-408 fosforilada conjugada con el epítopo peptídico P30.

El péptido tau 386-408 fosforilado (pS396/pS404) conjugado con P30 inmunogénico se formuló en TiterMax (400 µg/ml de péptido mezclado 1:1 vol:vol) siguiendo el protocolo del vendedor de TiterMax y los ratones se inyectaron por vía subcutánea con 20 µg de péptido (100 µl) de antígeno. A los ratones de control se les inyectó solo adyuvante. Todos los ratones inmunizados con péptido se sometieron a un refuerzo con 0,5 µg de péptido/Titermax (10 µg/ml de péptido formulado como se ha descrito anteriormente e inyectado) a intervalos mensuales. Los ratones finalmente se sometieron a un refuerzo con tau 386-408 fosforilada (pS396/pS404) conjugada con P30 sin Titermax 3 días antes de la recolección de esplenocitos seguido de fusión de esplenocitos con células SP-2. Se seleccionaron hibridomas primarios generados para ciclos de reclonación después de presentar unión positiva a tau 386-408 fosforilada (pS396/pS404) detectada por ELISA, y que presentaban actividad de unión preferente a antígenos S1 y P3 de EA y lisado de cerebro TG4510 (descrito más adelante en el Ejemplo 2B). Esta unión se comparó con la actividad de unión de dichos anticuerpos al lisado cerebral de los controles, utilizando transferencias puntuales y placas MSD o ELISA recubiertas con lisado cerebral.

Ejemplo 2A: generación de hibridomas

Los ratones se sometieron a un refuerzo con tau 386-408 fosforilada (pS396/pS404) conjugada con P30 sin Titermax 3 días antes de recoger los bazos de los ratones que mostraron respuesta seguido de fusión de esplenocitos con células SP-2. Se seleccionaron hibridomas para los ciclos de reclonación después de la unión positiva a tau 386-408 fosforilada (pS396/pS404) detectada por ELISA, y la actividad de unión preferente a los antígenos S1 y P3 de EA y lisado cerebral TG4510 en comparación con el lisado cerebral de los controles usando transferencias puntuales y placas MSD o ELISA recubiertas con lisado cerebral.

Ejemplo 2B: Análisis de transferencia de Western y transferencia puntual de anticuerpos específicos

Fraccionamiento bioquímico de tau

Se homogeneizaron tejidos cerebrales de humanos o ratones rTg4510 que sobreexpresaban la mutación de tau humana P301L en 10 volúmenes de solución salina tamponada con Tris que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa de la siguiente manera: Tris/HCl 50 mM (pH 7,4); NaCl 274 mM; KCl 5 mM; mezcla de inhibidor de proteasa al 1 % (Roche); cóctel I y II de inhibidor de fosfatasa al 1 % (Sigma); y fluoruro de fenilmetsulfonilo 1 mM (PMSF; Sigma). Los homogeneizados se centrifugaron a 27.000 x g durante 20 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (S1) y las fracciones de sedimento. Los sedimentos se volvieron a homogeneizar en 5 volúmenes de tampón con alto contenido de sal/sacarosa (NaCl 0,8 M, Sacarosa al 10 %, Tris/HCl 10 mM, [pH 7,4], EGTA 1 mM, PMSF 1 mM) y se centrifugaron como se ha indicado anteriormente. Los sobrenadantes se recogieron y se incubaron con sarkosyl (concentración final 1 %; Sigma) durante una hora a 37 °C, seguido de centrifugación a 150.000 x g durante una hora a 4 °C para obtener sedimentos insolubles en sarcosilo, denominados fracción P3 en la presente memoria. El sedimento P3 se resuspendió en tampón TE (Tris/HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM) a un volumen equivalente a la mitad del volumen original utilizado para los homogeneizados de cerebro.

Transferencias de Western y puntual

Los extractos de tejido fraccionados S1 y P3 se disolvieron en tampón de muestra de SDS que contenía DTT 0,1 M. Las muestras tratadas térmicamente (95 °C durante 10 min) se separaron mediante electroforesis en gel en geles Bis-Tris de SDS-PAGE al 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Las muestras para la transferencia puntual se colocaron directamente sobre membranas de nitrocelulosa (Amersham, Pittsburgh, PA) a concentraciones conocidas en las muestras. Se bloquearon las membranas de las transferencias de Western y puntual en leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-Tween (0,5%) pH 7,4, seguido de incubación en 1 µg/ml de C10-2 durante una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron e incubaron con IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Los anticuerpos unidos se detectaron usando un sistema de quimioluminiscencia mejorado (kit ECL PLUS; PerkinElmer). La cuantificación y el análisis visual de la inmunorreactividad de las transferencias de Western y puntual se realizaron con un sistema LAS-4000 Biolmaging Analyzer System conectado por ordenador (Fujifilm, Tokio, Japón) y el software Multi Gauge v3.1 (Fujifilm). La carga de proteína se ajustó por el volumen de las fracciones originales y se puede convertir al peso húmedo del tejido original.

Ejemplo 3. Ensayo de inhibición en fase fluida para la captura de AD-P3

Ejemplo 3A Objetivo: Cuantificar la inhibición con C10-2 humano y variantes mutadas de unión a antígenos tau pS396 en material cerebral AD-P3 a C10.2 murino. Se recubrieron placas MSD con C10-2 de ratón antes de la incubación con AD-P3 o se preincubó AD-P3 con variantes de C10.2 de interés. El grado de inhibición se representa como valores de CI50 que reflejan la afinidad aparente de la unión del anticuerpo en fase fluida a los antígenos. Los valores de CI50 se obtuvieron mediante ajuste a un modelo de unión de uno o dos sitios usando el software Graph Pad Prism. Se añadió un anticuerpo de control negativo (C10-1 de ratón) reactivo con Tau P (404) con fines comparativos (datos no mostrados).

Método: Las placas MSD se recubrieron con anticuerpo de captura (750 ng/ml de C10-2 murino en tampón carbonatado pH 8,5) durante una noche a temperatura ambiente seguido de bloqueo (30 min, en PBS, BSA al 3 %, NP40 al 0,1%) y se lavaron 5 veces (PBS, BSA al 0,1 %, NP40 al 0,1 %). Las concentraciones graduadas (0-1000 nM)

de anticuerpos se incubaron durante 60 min con material AD-P3 a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en placas MSD recubiertas con C10-2 de ratón como se ha descrito anteriormente. Las placas se lavaron 5 veces en PBS, BSA al 0,1 %, NP40 al 0,1 %) y se añadió anti-Tau humana total (MSD con etiqueta sulfo 1:50) para detectar la proteína tau capturada que refleja los antígenos tau libres no inhibidos.

Resultados: Los datos mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la captura de tau usando C10-2 humano y variantes (**Figura 1**). Las variantes C10-2_N32S y C10-2_N32S:A101T muestran una inhibición más fuerte (CI50 = 44 y 14 nM respectivamente, ajustado a modelos de unión de un sitio) mientras que C10-2 mostró una inhibición heterogénea reflejada por el mejor ajuste al modelo de unión de dos sitios (CI50 14 nM/630 nM). La unión de baja afinidad (CI50 = 630) fue predominante ya que la unión de anticuerpos de alta afinidad (CI50 = 14 nM) comprendía menos del 25 % de la unión total. Los resultados se muestran en la **Figura 1**.

Ejemplo 3B Objetivo: Cuantificar la inhibición con C10-2 humano variantes mutadas de la unión a péptidos tau 386-408 pS396 en un ensayo de inhibición en fase fluida. El grado de inhibición se representa como valores de CI50 que reflejan la afinidad aparente de la unión del anticuerpo. Los valores de CI50 se obtuvieron mediante ajuste a un modelo de unión de uno o dos sitios usando el software Graph Pad Prism. Se añadió un anticuerpo de control negativo (C10-1 de ratón) reactivo con Tau P (404) con fines comparativos (datos no mostrados).

Método: se recubrieron placas MSD con péptido Tau 386-408 pS396 en tampón carbonato, pH 9,5, durante una noche a temperatura ambiente seguido de bloqueo (30 minutos en PBS, BSA al 3 %, NP40 al 0,1%) y se lavaron 5 veces (PBS, BSA al 0,1 %, NP40 al 0,1 %). Se incubaron concentraciones graduadas (0-1000 nM) de tau 386-408 pS396 durante 60 min con 1 ng/ml de anticuerpo a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en placas MSD recubiertas con Tau 386-408 pS396 como se ha descrito anteriormente. Las placas se lavaron 5 veces en PBS, BSA al 0,1 %, NP40 al 0,1 %) y se añadió anti-Tau humana total (MSD con etiqueta sulfo 1:50) para detectar el anticuerpo unido que refleja los anticuerpos libres no inhibidos. Los resultados se muestran en la **Figura 2**.

25 **Ejemplo 4. Perfiles inmunohistoquímicos de los anticuerpos**

Tejidos

Ratón: Se recogieron tejidos de cerebro de ratón de ratones rTg4510 de 8 meses de edad. Estos ratones transgénicos expresan Tau humana mutada (P301L 0N4R) bajo un elemento sensible al tet-off en neuronas positivas para CamK2 y muestran una hiperfosforilación de tau pronunciada y formación de ovillos desde los 6 meses de edad en adelante. 30 Los compañeros de camada no transgénicos sirvieron como controles. Los cerebros de los ratones se fijaron mediante inmersión en paraformaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina. Humano: se adquirieron muestras de corteza frontal de cerebro humano incluidas en parafina fijadas con formalina de Tissue Solutions (Glasgow, Reino Unido). Se compararon tejidos de 3 donantes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en fase terminal (EA; estadio de Braak V-VI) con un donante de control de la misma edad sin demencia.

35 Inmunohistoquímica:

se cortaron secciones de cuatro μ m de grosor de tejidos humanos y de ratón en un micrótomo, se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígeno calentando las secciones en microondas en tampón citrato 10 mM, pH 6, durante 10 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 1 % seguido de suero porcino normal al 5 % en PBS, BSA al 1 %, Tritón X-100 al 0,3% (PBS-BT). Las secciones se incubaron durante la noche a 40 grados C con anticuerpos hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T diluidos en PBS-BT en el intervalo de concentraciones indicado en la Figura 1. Las secciones se lavaron en PBS, BSA al 0,25 %, Triton X-100 al 0,1%, antes de incubarse con un anticuerpo anti-humano porcino secundario biotinilado (n.º B1140; Sigma-Aldrich) a 1:200 durante 1 hora. Después de un lavado adicional, se aplicó el kit StreptAvidin-Biotin Complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y, finalmente, se visualizó la inmunorreactividad con diaminobencidina al 0,05%. Las secciones se tiñeron con hematoxilina como colorante de contraste para revelar la ubicación de los núcleos.

Resultados

hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T marcaron estructuras coherentes con tau patológica en 3 cerebros con EA (es decir, ovillos, hilos de neurópilo y neuritas distróficas). La intensidad de la inmunorreactividad dependía de la concentración. No se detectó marcaje aparente de, p. ej., células gliales o vasos. No se detectó inmunorreactividad en secciones de un cerebro de control. Del mismo modo, los 3 anticuerpos dieron lugar al patrón esperado de tau fosforilada tanto en el hipocampo como en la corteza de los cerebros rTg4510. En secciones de cerebro de ratones no transgénicos no se detectó inmunorreactividad.

Ejemplo 5. Marcaje de estructuras tau en ratones rTg4510 tras inyección i.v.

Método

Ratones rTg4510 de diez meses de edad. Estos ratones transgénicos expresan Tau humana mutada (P301L 0N4R) bajo un elemento sensible al tet-off en neuronas positivas para CamK2 y muestran una hiperfosforilación de tau pronunciada y formación de ovillos desde los 6 meses de edad en adelante. Además, está presente neurodegeneración a los 10 meses de edad en los ratones rTg4510 en regiones con fuerte patología. Los compañeros de camada tTA transgénicos simples sirvieron como controles. Los ratones recibieron una sola inyección a través de la vena de la cola de anticuerpos hC10-2, hC10-2_N32S o hC10-2_N32S_A101T a una concentración de 80 mg/kg. Se inyectó un volumen de 150 µl por ratón. Tres días después de la inyección, los ratones se sometieron a perfusiones durante 2 min con PBS seguido de perfusiones de 10 min con paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se crioprotegieron en sacarosa al 30 % y se cortaron en crio secciones de flotación libre de 40 micrómetros. Las secciones se incubaron con suero porcino normal al 5 % en PBS/BSA al 1 %/Tritón X-100 al 0,3 % durante 20 min, se lavaron en PBS y finalmente se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana secundario conjugado con AlexaFluor488 a 1:200 (n.º 709-545-149; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Para la tinción nuclear se utilizó Hoechst. Las secciones se lavaron en PBS, se montaron y se examinaron por microscopía de fluorescencia.

Resultados

La inyección i.v. de hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T tuvo como resultado la unión *in vivo* a estructuras diana en el hipocampo y la corteza en cerebros de ratones rTg4510 de edad avanzada (Figuras 4-7). El número de estructuras positivas observado variaba entre los animales rTg4510 individuales. En los ratones de control tTA, no se detectaron señales fluorescentes específicas después de la inyección de ninguno de los tres anticuerpos (Figura 4-7). La inyección de una IgG humana de control, que sirvió como control negativo, no dio como resultado señales en ratones rTg4510 (datos no mostrados). Las señales positivas en los cerebros de rTg4510 no aparecieron rápidamente como tinción intracelular y pueden representar material de tau extracelular liberado durante el proceso de neurodegeneración. En conjunto, estos datos sugieren que los anticuerpos hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T pueden penetrar en el parénquima cerebral y marcar específicamente dianas en ratones rTg4510 *in vivo*.

Ejemplo 6. Caracterización de la inmunorreactividad de tau en cerebros con enfermedad de Alzheimer

Tejidos:

se adquirieron muestras de corteza frontal de cerebro humano incluidas en parafina de Tissue Solutions (Glasgow, Reino Unido). Se incluyeron tejidos de donantes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en fase terminal (EA; estadio de Braak V-VI).

Inmunohistoquímica

se cortaron secciones de cuatro µm de grosor de tejidos humanos en un micrótomo, se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígeno calentando las secciones en microondas en tampón citrato 10 mM, pH 6, durante 10 minutos. Las secciones se incubaron con suero porcino normal al 5 % en PBS, BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,3 % (PBS-BT) seguido de incubación durante una noche a 4 °C con anticuerpos hC10-2 o hC10-2_N32S_A101T diluidos en PBS-BT. Las secciones se lavaron en PBS, BSA al 0,25 %, Triton X-100 al 0,1 %. La inmunorreactividad se visualizó mediante anticuerpo anti-IgG humana secundario conjugado con AlexaFluor488 (1:200; n.º 709-545-149, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Para la inmunofluorescencia doble, las secciones se incubaron conjuntamente con AT8 (1:500; n.º MN1020, ThermoFisher, Waltham USA) o el anticuerpo tau humano total E1, anticuerpo de conejo obtenido a medida producido contra el extremo N-terminal 19-33 de tau (Crowe et al, 1991). Las inmunorreactividades de AT8 y E1 se visualizaron con AlexaFluor568 anti-ratón (1:400; n.º A10037, ThermoFisher) y AlexaFluor568 anti-conejo (1:400; n.º A10042, ThermoFisher), respectivamente. Las secciones se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Resultados

En las secciones de EA con tinción doble para la tau total N-terminal y la tau pS396, se marcó una población de neuronas portadoras de ovillos tanto con E1 como con los anticuerpos hC10-2 y hC10-2_N32S_A101T (Figura 7). Varios ovillos de tau solo se marcaron con anticuerpos hC10-2 y hC10-2_N32S_A101T (Figura 7, flechas). Se ha demostrado previamente que la tau extracelular (ovillos fantasma) no se tiñe con anticuerpos contra el extremo N-terminal de tau (p. ej., Bondareff et al, 1990; Braak et al, 1.994; Flores-Rodrigues et al, 2015). Por tanto, las especies de tau marcadas por anticuerpos hC10-2 o hC10-2_N32S_A101T solo probablemente representan ovillos fantasma extracelulares.

Transferencias de Western e inmunoprecipitación

Procedimiento experimental y descripción experimental

Se utilizaron ratones transgénicos rTg4510: se puso un ADNc de tau humana con la mutación P301L (4R0N TauP301 L) cadena abajo de una construcción de elemento respondedor-operón de tetraciclina (TRE). Para activar el transgén, el respondedor tiene que coexpresarse con una construcción de activador, que consiste en el sistema de expresión génica condicional de tetraciclina (tTA). El sistema activador tTA se puso cadena abajo del promotor de CaMKIIα,

restringiendo así la expresión de TRE principalmente en las estructuras prosencefálicas. El elemento de respuesta del transgén tau se expresó en la cepa de ratón FVB/N (Taconic) y el sistema activador tTA se mantuvo en la cepa de ratón 129S6 (Taconic). Su descendencia F1 portaba transgenes respondedor y activador (rTg4510) junto con ratones compañeros de camada no transgénicos (no tg) y transgénicos simples. Solo se utilizaron ratones F1 para los experimentos. Todos los ratones fueron criados en Taconic, Dinamarca y genotipados mediante el análisis del ADN de la cola utilizando el par de cebadores 5'-GATTACAGCGCATTAGAGCTG-3' y 5'-GCATATGATCAATTCAAGGCCGATAAG-3' para el transgén tTA activador y 5'-TGAACCAGGATGGCTGAGCC-3' y 5'-TTGTCATCGCTTCCAGTCCCCG-3' para el transgén mutante respondedor a tau. Los ratones se alojaron en grupos y recibieron agua y comida (Brogaarden, Dinamarca) ad libitum, así como materiales de enriquecimiento. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12 h; la temperatura ambiente fue de 21 ± 2 °C y la humedad relativa del $55\% \pm 5\%$. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación danesa sobre animales de experimentación (número de licencia 2014-15-0201-00339).

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical para preservar el entorno metabólico del cerebro y prevenir artefactos que pudieran alterar los perfiles bioquímicos de tau. Los cerebros de los ratones se bisecaron sagitalmente por la línea media para producir dos hemisferios. La corteza cerebral y el hipocampo del hemisferio derecho de cada animal se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se adquirieron cortezas humanas congeladas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) y donantes de control sanos (HC) de edad avanzada en Tissue Solution (Glasgow, Reino Unido). Las muestras de cerebro humano tuvieron un tiempo de procesamiento post mortem similar < 6 h, y se caracterizaron con respecto a la patología amiloide y tau y se seleccionaron muestras de EA clasificadas como muestras de estadio de Braak V-VI.

Para inmunoprecipitar la proteína tau de los lisados cerebrales se usó un kit de inmunoprecipitación Crosslink (Thermo Fisher Pierce 26147) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el anticuerpo se unió a la proteína A/G más agarosa seguido de la reticulación del anticuerpo unido con DSS (suberato de disuccinimidilo). Se preparó homogeneizado de cerebro en tampón Tris (Tris 25 mM/HCl pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y mezcla completa de inhibidor de proteasa y fosfatasa) y se realizó un aclarado previo durante la noche a 4 °C con resina de agarosa de control. El lisado con aclarado previo se incubó con resina con anticuerpo reticulado durante una noche a 4 °C, seguido de elución del antígeno con 50 μ l de tampón de elución (pH 2,8) y se centrifugó inmediatamente en tubos de recogida que contenían 5 μ l de Tris 1 M, pH 9,5. La tau inmunoprecipitada se disolvió en tampón de muestra de SDS que contenía ditiotreitol (DTT, 100 mM), se trató con calor (95 °C durante 10 min) y se sometió a transferencia de Western como se describe a continuación.

Las concentraciones de tau humana se midieron en homogeneizados de cerebro y lisados con aclarado previo mediante ELISA para la tau humana total de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Los tejidos se homogeneizaron en 10 volúmenes de solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa como se indica a continuación: Tris/HCl 50 mM (pH 7,4); NaCl 274 mM; KCl 5 mM; mezcla de inhibidor de proteasa al 1 % (Roche); cóctel I y II de inhibidor de fosfatasa al 1 % (Sigma); y fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF) 1 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 27.000 x g durante 20 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (S1) y las fracciones de sedimento. Los sedimentos se volvieron a homogeneizar en 5 volúmenes de tampón con alto contenido de sal/sacarosa (NaCl 0,8 M, Sacarosa al 10 %, Tris/HCl 10 mM, [pH 7,4], EGTA 1 mM, PMSF 1 mM) y se centrifugaron como se ha indicado anteriormente. Los sobrenadantes se recogieron y se incubaron con sarkosyl (concentración final 1 %; Sigma) durante una hora a 37 °C, seguido de centrifugación a 150.000 x g durante una hora a 4 °C para obtener fracciones extraíbles con sal y sarkosyl (S3) e insolubles en sarkosyl (P3). El sedimento P3 se resuspendió en tampón TE (Tris/HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM) a un volumen equivalente a la mitad del volumen original utilizado para los homogeneizados de cerebro. Para enriquecer las fracciones S1 en especies de tau hiperfosforiladas, se separó una porción de la fracción S1 mediante centrifugación adicional a 150.000 x g durante 20 min del sobrenadante (S1s) y las fracciones precipitadas (S1p). El sedimento S1p se resuspendió en tampón TBS hasta un volumen equivalente a una quinta parte del volumen original de S1 usado. Se disolvieron extractos de tejido fraccionado S1, S1p y P3 en tampón de muestra de SDS que contenía DTT (100 mM). Las muestras tratadas térmicamente (95 °C durante 10 min) se separaron mediante electroforesis en gel en geles Bis-Tris de SDS-PAGE al 4-12 % (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Despues de bloquear con una solución de bloqueo que contenía leche desnatada al 5 % y Tritón-X100 al 0,1% en TBS, las membranas se incubaron con 1 μ g/ml de hC10.2, hC10-2_N32S, hC10-2_N32S_A101T o anticuerpo de conejo anti-tau pS396 (Invitrogen). Las membranas se lavaron y se incubaron con anticuerpos anti-IgG humana o anti-conejo conjugados con peroxidasa (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Los anticuerpos unidos se detectaron usando un sistema de quimioluminiscencia mejorado (kit ECL PLUS; Perkin Elmer). La cuantificación y el análisis visual de la inmunorreactividad de la transferencia de Western se realizaron con un sistema LAS-4000 Biolimaging Analyzer System conectado por ordenador (Fujifilm, Tokio, Japón) y el software Multi Gauge v3.1 (Fujifilm). Para detectar la proteína tau, se cargaron aproximadamente 2 μ g de S1 de ratón, 20 μ g de S1 de cerebros humanos y volúmenes iguales de las diferentes fracciones (S1, S1p y P3) en la SDS PAGE.

Detección de tau patológica por transferencia de Western

60 Se prepararon homogeneizados de prosencéfalo de tres ratones rTg4510 de 32 semanas de edad y compañeros de camada de control no transgénicos (no tg) y se aislaron muestras corticales combinadas de cuatro donantes con EA

y cuatro controles sanos (HC) en una fracción de sedimento soluble (S1), una de sedimento soluble en TBS (S1p) y una fracción insoluble en sarkosyl (P3). Se usaron hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T a 1 µg/ml en una transferencia de Western y se detectó tau patológicas en los ratones rTg4510 y en los donantes con EA. Se observó

5 detección de tau de 55 y 64 kDa en S1 y de tau de 64 y 70 kDa en fracciones P3 y S1p de ratones rTg4510 de 32 semanas de edad. Adicionalmente, se observaron tres bandas de tau truncadas < 50 kDa en la fracción P3. No se detectó señal en S1p y P3 de compañeros de camada de control no tg que no expresaban tau transgénica humana. Se detectó una señal débil alrededor de 50 kDa en la fracción S1 de ratones no tg, que lo más probable es que represente tau murina endógena fosforilada en el resto S396 (Figura 8A-8C). Se resume que hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T detectaron pS396 tau, y especies de tau tanto normales fosforiladas de 55 kDa como hiperfosforiladas de 64 kDa en ratones rTg4510. La señal más fuerte se observó con hC10-2_N32S_A101T.

10 En las fracciones S1, S1p y P3 de donantes con EA, hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T detectaron el frotis de tau de EA típico y el patrón patológico de cuatro bandas de tau (tau de 54, 64, 69 y 74 kDa). Como cabía esperar, las especies de tau hiperfosforilada insoluble en sarkosyl aisladas de la fracción P3 fueron las más 15 pronunciadas, seguidas de especies de tau hiperfosforilada soluble enriquecidas en la fracción S1p. No se detectó señal en las fracciones P3 del control sano (HC). En las fracciones S1 y S1p de HC se detectó una señal débil alrededor de 55 kDa, que probablemente representa tau fosforilada normal en el resto S396 (Figura 8A-8C). Se resume que hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T detectaron la característica típica de frotis de tau para la EA y los 20 patrones patológicos de cuatro bandas de tau que representan la tau hiperfosforilada. La señal más fuerte se observó con hC10-2_N32S_A101T.

20 Inmunoprecipitación de tau patológica

Para determinar la capacidad de hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T para unirse a tau en condiciones no desnaturalizantes, se estableció un protocolo de inmunoprecipitación (IP) de tau en donde los anticuerpos de tau se 25 reticularon covalentemente en la resina de proteína A/G y, por lo tanto, da IP libres de contaminaciones de anticuerpo. Para el análisis de tau por SDS-PAGE, la presencia de las cadenas pesadas del anticuerpo utilizado para la IP puede 30 obstruir las señales ya que ambas proteínas se detectan alrededor de 50 kDa. Se investigó la eficacia de hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T para eliminar la tau patológica del cerebro humano. Como antígeno, se 35 utilizaron 500 µg de lisado con aclarado previo de homogeneizados de cerebro de cuatro donantes con EA y HC agrupados que contenían 0,1 µg y 0,15 µg de tau humana (determinada por ELISA de tau humana), respectivamente. hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T (10 µg) eliminaron especies de tau de 54, 64, 69 y 74 kDa (las cuatro 40 bandas patológicas de tau) y en el frotis de EA procedente de homogeneizados de EA con aclarado previo (relación antígeno/ab 1:100) visualizado por un anticuerpo políclonal de conejo anti-tau pS396 (Figura 9). Comparando la intensidad de las bandas de tau de cerebros con EA eliminadas con hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T para 45 controlar el anticuerpo IgG humano y el cerebro HC, se puede resumir que hC10.2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T inmunoprecipitaban tau hiperfosforilada en el sitio pS396 exclusivamente de cerebros con EA y fueron eficaces en una relación antígeno/anticuerpo de 1:100.

Ensayo celular y de agregación

Se transfectaron células HEK293 transitoriamente con tau-P301L-FLAG humana en placas de 6 pocillos 24 horas 40 después del cultivo, 24 horas después se incubaron con homogeneizado de cerebro durante 24 h, y posteriormente se dividieron y se volvieron a cultivar las células y se recogieron después de 24 horas más. Las células se lisaron y se 45 sonicaron en PBS, complementado con tritón X al 1 %, tampón con inhibidores de proteasa y fosfatasa Phos-stop y complete (Roche) y se ultracentrifugaron a 100.000 x g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en SDS, se sonicó y se ultracentrifugó durante 30 min a 100.000 x g. Los sobrenadantes se analizaron mediante transferencia de Western. Las células que expresaban tau-P301L humana mostraron tau insoluble (fracción de SDS, detección de E1/FLAG), hiperfosforilada (detección de pS396) tras la siembra con homogeneizados de cerebro total de ratones transgénicos para tau rTg4510.

50 Las células tratadas con homogeneizado de cerebro de control de ratones tTA mostraron una ausencia de tau humana hiperfosforilada agregada. Adicionalmente, se analizaron lisados celulares totales de células HEK293 usando el ensayo de agregación de tau de Cisbio. Este ensayo se basa en la fluorescencia resuelta en el tiempo utilizando el mismo anticuerpo para el Ab donante (conjugado con Tb3+) y el aceptor (conjugado con d2) en FRET. Se mezcló una muestra de 10 µl con 10 µl de mezcla de anticuerpos y se incubó durante 20 horas. La placa se leyó en el lector de placas Pherastar para evaluar la fluorescencia resuelta en el tiempo (señal FRET medida/integrada después de encender la luz de excitación). El ensayo mide tau agregada tanto en material de autopsia humana como en ratones rTg4510 y en células HEK sembradas con alta especificidad y sensibilidad. Los resultados se muestran en la **Figura 10**.

55 **Ejemplo 7. Inmunoempobrecimiento de tau**

Se prepararon extractos de cerebro de Alzheimer a partir de corteza prefrontal post mortem congelada en PBS frío estéril en volumen 10x. El tejido se homogeneizó usando un homogeneizador con cuchillas y después se sometió a sonicación, a 5 pulsos de 0,9 segundos en la potencia 2 (sonificador Branson). A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se dividieron en alícuotas, se congelaron de forma

inmediata y se conservaron a -80 grados C hasta su uso.

Se inmovilizaron 25 µg de anticuerpo (variantes de C10-2 humanizadas y 2.10.3, ratón AT8, Thermo Scientific mn 1020) en 125 µl de suspensión de microesferas magnéticas Dynabead (kit de inmunoprecipitación Dynabeads Protein G Novex, n.º de cat. 10007D). Después de un lavado minucioso, las microesferas recubiertas se mezclaron con 5 cantidades variables de microesferas lavadas no recubiertas. Empezando con microesferas recubiertas con Ab al 100 %, que correspondían a 5 µg de anticuerpo, y bajando hasta microesferas no recubiertas al 100 %. La cantidad total de microesferas fue la misma en todas las muestras. Las microesferas se mezclaron con 20 µl de extracto de EA y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Las microesferas magnéticas se separaron del extracto y los extractos se dividieron en alícuotas, se congelaron de forma inmediata y se mantuvieron a -80 grados C hasta su uso.

10 Análisis de empobrecimiento mediante transferencia de western

Las muestras se hirvieron en tampón de carga SDS 1x y DTT 100 mM. Se cargó un volumen correspondiente a 3 µl de extractos en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4-12 % (LifeTech Novex). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-FL (0,45 µm, IPFL10100, Millipore). La membrana se bloqueó con 15 tampón de bloqueo SEA (Prod n.º 37527, Thermo). Los niveles de Tau y P-tau se evaluaron en las muestras usando Tau5 (Tau5 es un anticuerpo anti-tau disponible comercialmente cuyo epítopo se describe como un epítopo que está en el medio de los aminoácidos 210-241 de Tau. Es un monoclonal de ratón para Tau. Abcam ab80579, 1:2000), C10-2 de ratón (1 µg/ml), P-S199/202 (Invitrogen 44768 G, 1:1000), P-S422 (Abcam ab79415, 1:750), IPN humano (1 µg/ml). Como controles de carga se usaron gapdh y actina (Abcam ab9484, 1:2000, Sigma A5441, 1:20000). Se utilizaron anticuerpos IgG conjugados con fluoróforo secundario (IRDye 800CW cabra anti-humano, IRDye 800CW, cabra anti-conejo, IRDye 680 cabra anti-ratón, LI-COR Biosciences) y la señal se cuantificó utilizando el software 20 Odyssey CLx e Image studio (LI-COR Biosciences). Se realizó la cuantificación de las bandas individuales así como de la señal en carriles completos y, a partir de esto, se trazaron las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y, cuando fue posible, se estimaron los valores de efecto máximo y CE50.

Resultados

25 Los anticuerpos 2.10.3 y C10-2 eliminan una pequeña fracción de tau de la preparación del cerebro con enfermedad de Alzheimer. Esto demuestra la selectividad por un subconjunto de tau dentro del contenido total de proteína tau. 2.10.3, diseñado para tener especificidad por tau pS422 elimina hasta el 24 % de la cantidad total de tau, mientras que C10-2 elimina hasta el 15 % de la tau total (véase la Figura 11). Por estos datos, puede interpretarse que el 30 subconjunto pS396 es un subconjunto más pequeño de tau, siendo iguales todos los demás factores. Como alternativa, por los datos se puede interpretar que los anticuerpos C10-2 son más selectivos para pS396 que el anticuerpo 2.10.3, que es selectivo para pS422.

2.10.3 y C10-2 eliminan más del 90 % de la tau fosforilada en la serina 422, aunque la cantidad de anticuerpo necesaria para eliminar el 50 % de la tau pS422 difiere, ya que para 2.10.3 se necesitaron 0,42 µg de anticuerpo y para C10-2 se necesitaron 0,27 µg para obtener el mismo efecto (véase la Figura 12). En una realización de la invención, el 35 anticuerpo es específico para un epítopo dentro de 386-404 en donde el resto de serina 396 de tau humana está fosforilado y en donde se elimina el 80 % de tau pS422 (en estudios de inmunoempobrecimiento mediante análisis de transferencia de Western) usando menos de 1 µg del anticuerpo.

40 C10-2 elimina eficazmente la tau que está fosforilada en la serina 396 (efecto máximo: 88 % y la mitad del efecto se alcanza utilizando 0,30 µg de anticuerpo). 2.10.3 elimina una fracción más pequeña de tau que está fosforilada en la serina 396 (efecto máximo: 60 % y la mitad de ese efecto se alcanza cuando se utilizan 0,63 µg de anticuerpo) (véase la Figura 13). Esto indica que todas las Tau que están fosforiladas en la serina 422, también están fosforiladas en la serina 396, pero hay una porción de tau hiperfosforilada que está fosforilada en la serina 396 donde no está presente la serina fosforilada en la posición 422. En una realización de la invención, el anticuerpo es específico para un epítopo dentro de 386-404 en donde el resto 396 de tau humana está fosforilado y en donde se elimina el 80 % de tau pS396 (en estudios de inmunoempobrecimiento mediante análisis de transferencia de Western) usando menos de 1 µg del anticuerpo.

45 Una gran parte de la tau, que se elimina por C10-2, también está fosforilada en la serina 199/202, ya que el 69 % de la tau que tiene esa fosforilación se ve afectada por el inmunoempobrecimiento (50 % del efecto cuando se usan 0,34 µg de anticuerpo). El inmunoempobrecimiento por 2.10.3 no da una curva sigmoidea de respuesta a la dosis en la tau pS199/202, aunque se observa una caída en la señal al aumentar la cantidad de anticuerpo (reducción máxima del 52 % cuando se usa la cantidad máxima de anticuerpo (5 µg) (véase la Figura 14). En una realización de la invención, el anticuerpo es específico para un epítopo dentro de 386-404 en donde el resto de serina 396 de tau humana está fosforilado y en donde se elimina el 80 % de tau P-S199/202 (en estudios de inmunoempobrecimiento mediante análisis de transferencia de Western) usando menos de 1 µg del anticuerpo.

50 55 Estos resultados indican que el anticuerpo C10-2 que se dirige a la serina fosforilada 396 se une a un grupo mayor de tau hiperfosforilada que el anticuerpo 2.10.3 que se dirige a la serina fosforilada en la posición 422.

Al investigar las bandas individuales en la transferencia de Western después del inmunoempobrecimiento, se identificó una banda de 25 kDa como fosforilada en la serina 396. C10-2 produjo inmunoempobrecimiento de este fragmento,

pero 2.10.3 y AT8 no eliminaron este fragmento (véase la Figura 15). Por tanto, C10-2 tiene una característica única que elimina esta forma truncada de tau en extractos de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 8. Comparación de variantes de C10-2

Todas las variantes de C10-2 tuvieron la misma eficacia en el ensayo de inmunoempobrecimiento (véase la Figura 16). Estos resultados demuestran que las mutaciones introducidas no han cambiado la unión funcional a la Tau específica del cerebro con Alzheimer.

8a. Tratamiento con anticuerpos en ratones rTg4510 sembrados

Se utilizaron ratones transgénicos que expresaban Tau mutada humana (P301L 0N4R) bajo un elemento sensible al tet-off en neuronas positivas a CamK2 (rTg4510). Este modelo normalmente comienza a desarrollar patología Tau a los 3 meses de edad, pero al alimentar a las madres con doxiciclina durante el embarazo y durante las primeras 3 semanas de vida de la cría, la patología se desarrolla en una etapa posterior (a partir de los 6 meses de edad). Los ratones pretratados con doxiciclina fueron tratados crónicamente con mC10-2, hC10-2, 2.10.3 o anticuerpo de control, a 15 mg/kg/semana a partir de los 2 meses de edad. A los 2,5 meses, se infundió extracto de cerebro con Alzheimer en el hipocampo. Se anestesiaron 20 ratones mediante inhalación de isoflourano fijados en un marco estereotáctico. Se expuso el cráneo y se ajustó hasta que el bregma y lambda estuvieron nivelados. Se taladró un orificio en el cráneo a una distancia de 2 mm lateral (derecha) y 2,4 mm posterior del bregma. Se usó una punta biselada de jeringa de 10 µl (SGE) para inyectar el material de siembra 1,4 mm ventral a la superficie del cerebro en las coordenadas mencionadas anteriormente. Se infundieron lentamente 2 µl de los extractos, descritos en el Ejemplo 7, en el sitio (1 µl/minuto) y se dejó la jeringa durante 5 minutos antes de retirarla. La herida se cerró con puntos de sutura y los ratones se mantuvieron calientes mientras se despertaban. Los ratones se alojaron durante 3 meses y luego se sacrificaron y se fijaron en perfusión con un 4 %. Los ratones se trataron con anticuerpos hasta el sacrificio, 3 meses después de la siembra.

Inmunohistoquímica

Los cerebros fijados se cortaron en secciones coronales de 35 µm en NSA 30 y una de cada 6 secciones se tiñó para detectar ovillos tau (tinción de plata de Gallyas). Se contaron las neuronas teñidas positivamente (soma) en los lados ipsi y contralateral del hipocampo de todos los cerebros. Se incluyeron todas las subregiones del hipocampo. Se contaron ocho secciones por cerebro. Los resultados reflejan la suma de neuronas positivas de las 8 secciones.

Análisis estadístico: la varianza es significativamente diferente al comparar los grupos. Por lo tanto, se utilizaron la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn.

30 Resultados: Los extractos provocaron la siembra de la patología de ovillos en el hipocampo ipsilateral. El tratamiento con mC10-2 redujo significativamente la patología de ovillos en el hipocampo sembrado en un 57 % ($P<0,05$). Hubo una tendencia clara que indicaba que hC10-2 reducía la patología. 2.10.3 no mostró efecto (véase la Figura 17).

Ejemplo 8b. Los efectos anti-siembra de las variantes de C10.2

Objetivo del estudio

35 Se ha sugerido que la propagación transcelular de agregados de tau contribuye al desarrollo patológico y la propagación topológica de la enfermedad de Alzheimer dentro del SNC. Se establecieron modelos de siembra *in vitro* mediante los cuales la tau humana celular expresada en células HEK293 se siembra con agregados de tau patológicos aplicados extracelularmente. El propósito de este estudio fue evaluar y comparar el efecto terapéutico del C10.2 humano monoclonal y las variantes sobre la siembra en un paradigma de tratamiento. La siembra pretende significar la introducción de una cantidad de tau hiperfosforilada (semilla) que inicia la hiperfosforilación/plegamiento incorrecto de tau expresada celularmente.

Antecedentes que establecen la relevancia del estudio

45 Los depósitos de placas extracelulares de Aβ y filamentos helicoidales emparejados intraneuronales de tau son rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Las inclusiones intraneuronales de tau se componen principalmente de formas amiloides hiperfosforiladas, insolubles en disolvente, de tau y se encuentran en pacientes con EA depositadas en un patrón espacio-temporal que sugiere la propagación de agregados dentro del SNC. Se ha demostrado experimentalmente que los agregados de tau se propagan de unas células a otras tanto *in vivo* como *in vitro* en un mecanismo similar al de los priones. Esta presencia de propagación extracelular que afecta a la propagación de la enfermedad abre las puertas a la inmunoterapia con anticuerpos que penetren en el SNC.

50 Se ha demostrado que la aplicación de agregados/semillas de tau conduce a la agregación de tau celular *in vitro* (Frost *et al.*, 2009, Guo y Lee 2011, Yanamandra *et al.*, 2013). Se ha establecido un modelo de siembra *in vitro*, con el que se utilizan homogeneizados de cerebro en bruto de ratones Tg4510 (que contienen tau humana agregada) para sembrar tau 0N4R humana con una mutación P301L expresada transitoriamente en células HEK293. De manera significativa, no se pueden detectar agregados residuales de tau (semillas) en las células de control de pcDNA

sembradas, por lo que todas las lecturas detectan la conversión de tau celular y no detectan ninguna señal del material de siembra exógeno. En este ensayo se determinaron los efectos anti-siembra de diferentes variantes de hC10.2.

Variantes

Anticuerpo C10-2 (hC10.2)

5 Anticuerpo N32S (hC10.2 N32S)

Anticuerpo N32Q (hC10.2 N32Q)

Anticuerpo N32S,D55E (hC10.2 N32S D55E)

Anticuerpo N32Q,D55E (hC10.2 N32Q D55E)

Anticuerpo N32S,A101T (hC10.2 N32S A101T)

10 Artículo(s) de referencia

hlgG1 de control (B12)

Sistema de prueba/Animales

Células HEK293 transfectadas transitoriamente con hTau-P301L (0N4R).

Diseño experimental

15 Material de siembra: se prepararon homogeneizados de Tg4510 (y controles) de ratones de 12 meses de edad como homogeneizados al 10 % en TBS sin inhibidores mediante homogeneización con microesferas y se sonicaron. Los homogeneizados se centrifugaron a 21000 x g durante 15 min y la fracción soluble se utilizó para la siembra.

20 Ensayo de siembra de HEK293: en este ensayo, se cultivan 600.000 células HEK293 por pocillo en una placa de 6 pocillos el día 0. El día 1, las células se transfecan con 4 µg de ADN plasmídico usando 10 µl de lipofectamine2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante. El medio se cambia después de 4 h. El día 2, las células se siembran con homogeneizado de cerebro en bruto de ratones Tg4510 o tTa de 12 meses de edad. Se aplican homogeneizados que contienen 40 µg de proteína total (aproximadamente 65 ng de tau humana total para los homogeneizados tg4510) al medio de cada pocillo. Para los experimentos de tratamiento con anticuerpos, los homogeneizados se preincuban con o sin anticuerpos durante una noche a 4 grados. Seis horas después de la siembra, el medio se cambia a medio con bajo contenido de suero para reducir la proliferación celular y se vuelven a aplicar los anticuerpos.

25 El día 3 (24 horas después de la siembra), las células se tripsinizan durante 3 minutos para degradar las semillas extracelulares y se vuelven a cultivar a: 800.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos para experimentos de fraccionamiento, 20.000 células por 96 pocillos para el ensayo de agregación de tau de Cisbio y 10.000 células por 96 pocillos para la evaluación de la captación de anticuerpos mediante imágenes de alto contenido. Se vuelven a aplicar anticuerpos a cada pocillo.

30 Fraccionamiento celular: 48 horas después de la siembra, se recogen células para el fraccionamiento mediante raspado en PBS frío, se sedimentan y se lisan en TBS con tritón-X al 1 % con inhibidores de fosfatasa y proteasa y se sonicán. Despues de la ultracentrifugación (100.000 x g durante 30 min a 4 °C), el sedimento se resuspende en SDS al 1 %, se sonica y se ultracentrifuga una vez más. Las fracciones solubles en Triton-X y SDS se analizan mediante transferencia de Western para tau total (E1) y fosforilación de tau en S396 (D1.2). La señal D1.2 se cuantifica mediante inmunofluorescencia en la máquina de formación de imágenes Odyssey.

35 Ensayo de agregación de tau de Cisbio: 48 horas después de la siembra, las células para el ensayo de agregación de Cisbio se lavan en PBS enfriado con hielo y se congelan en seco. Las células se lisan en tritón-X al 1 % con inhibidores de fosfatasa/proteasa y benzonasa (una RNasa y DNasa) y se incuban en un agitador orbital, a 650 RPM durante 40 min a 4 grados C. El lisado celular total se analiza en busca de agregados de tau mediante el ensayo de agregación de tau de Cisbio, un ensayo basado en el uso del mismo anticuerpo acoplado a un donante y un aceptor para las mediciones de FRET utilizando fluorescencia homogénea de resolución temporal (HTRF®, Cisbio). La tau monomérica solo puede unirse al anticuerpo aceptor o donante, ya que compiten por el mismo epítopo de unión = sin FRET. Por el contrario, la tau oligomérica puede unirse tanto al donante como al aceptor = señal FRET. Se determina la proteína total para todas las muestras mediante BCA y la relación señal/ruido de la muestra se normaliza con respecto a la proteína y se representa como agregación de tau relativa utilizando 8 réplicas técnicas.

40 Captación de anticuerpos: 48 horas después de la siembra, las placas para la captación de anticuerpos se fijaron en paraformaldehído al 4 % y sacarosa al 4 % y se tiñeron con un anticuerpo secundario anti-humano. La captación de anticuerpos se confirmó usando Cellomics.

Análisis de datos/Estadísticas

Los datos se presentan como los datos agrupados de cuatro réplicas biológicas independientes realizadas y analizadas durante dos semanas diferentes +/- SEM. Los datos se analizan utilizando un ANOVA de un solo factor con una prueba de comparación múltiple de Tukey, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Resultados

5 hC10.2 tuvo un impacto reductor sobre la siembra y la tau hiperfosforilada insoluble en aproximadamente un 40 % en comparación con el control. Todos los demás anticuerpos mostraron un efecto similar o superior a hC10.2. En particular, las variantes N32S y N32S_A101T de hC10.2 mostraron efectos más fuertes con un 45 % y un 62 % de reducción en la tau agregada. La variante N32S_A101T mostró un efecto significativo más fuerte sobre la agregación en comparación con hC10.2.

10 **Ejemplo 8C: Estudios de estabilidad sobre hC10.2 y variantes de la invención**Objetivo del estudio

Este estudio se realizó para evaluar los problemas básicos de estabilidad con los anticuerpos de la invención, centrándose en condiciones de estrés para revelar cualquier diferencia potencial en las variantes.

Diseño del estudio

15 Todas las muestras se prepararon inicialmente en condiciones de partida idénticas (tampón, concentración y nivel de agregado). Esto eliminaría las diferencias en las propiedades iniciales que potencialmente podrían influir en el desarrollo posterior del comportamiento de la muestra. Se mantuvo un control a -80 °C y se analizó en paralelo con las muestras sometidas a estrés (40 °C). Las muestras se retiraron a 40 °C en diferentes momentos y se analizaron simultáneamente al final mediante SEC-uplc, mapeo de péptidos por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

Variantes

20 Anticuerpo C10-2 (hC10.2)
 Anticuerpo N32S (hC10.2 N32S)
 Anticuerpo N32Q (hC10.2 N32Q)
 25 Anticuerpo N32S,D55E (hC10.2 N32S D55E)
 Anticuerpo N32Q,D55E (hC10.2 N32Q D55E)
 Anticuerpo N32S,A101 (hC10.2 N32S A101T)
 Anticuerpo A101T (hC10.2 A101T)
 30 Anticuerpo D55E (hC10.2 D55E)
 Anticuerpo N32Q, A101T (hC10.2 N32Q A101T)

Artículo de referencia

Como referencia se usaron las muestras de anticuerpos almacenadas a -80 °C durante el estudio.

Información de antecedentes

35 Los aspectos de estabilidad de un anticuerpo monoclonal son importantes tanto para la fabricación, como para el almacenamiento final y la formulación de la sustancia farmacéutica. En este estudio, se han sometido los anticuerpos a condiciones de estrés mediante ciclos de congelación-descongelación, temperatura alta y pH bajo para revelar si hay problemas evidentes en alguno de los candidatos.

Materiales y métodos

40 Para los estudios de desamidación, se introducen en viales muestras de 1 ml y se incuban a 40 °C. En puntos de tiempo predefinidos, una muestra se pasa a -80 °C y se almacena hasta el análisis.

Estudios de desamidación

45 Se estudia la desamidación de los restos de Asn a nivel de los péptidos para obtener información detallada sobre los restos reales en cuestión. Por tanto, el mAb se digiere con tripsina porcina después de la reducción y alquilación (ácido yodoacético) utilizando protocolos estándar. Los péptidos se separaron en una columna CSHT130 C18 de 1,7 µm y se introdujeron en un instrumento de MS XEVO QTOF (Waters) que funcionaba en modo MSe. A lo largo de la serie

se utilizaron parámetros idénticos. Los mapas de péptidos de todos los puntos temporales se analizaron en BiopharmaLynx y se cuantificaron con las siguientes limitaciones: solo se incluyen péptidos desamidados identificados positivamente, no se incluyen fragmentos de origen. El % de desamidación de cada péptido identificado se controla a lo largo del tiempo.

5 Esquema del método SEC

La agregación se determinó mediante cromatografía SEC en una columna ACQUITY UPLC® BEH200 SEC 1,7 µm, 4,6 x 150 mm, en un Acquity UPLC con detector TUV (Waters). Se aplicaron muestras de 20 µl ajustadas a 100 µg/ml (diluidas en tampón de ejecución: PBS de Gibco - Invitrogen nº 14190-094 + NaCl 0,1 M) a la columna a 0,4 ml/min y se separaron durante 6 min por elución isocrática.

10 Los datos se analizan mediante MassLynx y se utiliza AUC para cuantificar los niveles de agregación.

Experimento de pH bajo

Se aplicó hC10.2 a una columna de proteína G y se eluyó a pH 2,8 usando condiciones estándar. La muestra se mantuvo a pH 2,8 y las alícuotas se retiraron a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 min y se neutralizaron antes de la desalinización en PBS. Las muestras se analizaron para determinar la afinidad de unión, agregación y desamidación.

15 Caracterización de hC10.2 en condiciones de estrés: Desamidación a 40 °C y 28 días

Se observa desamidación de Asn en varios sitios menores y tres principales cubiertos por péptidos LC:T2, HC:T36 y HC:T25. En estos casos, la desamidación aumenta a lo largo del tiempo, finalizando al 75 %, 38 % y 28 % respectivamente. A diferencia de lo que ocurría con los péptidos HC:T36 y T25, no se esperaba que los restos de Asn (LC N32 y N34) en el péptido LC:T2, basándose en el análisis in silico (motivo de secuencia), fueran propensos a la desamidación, pero sorprendentemente, en el experimento real, se diferencian claramente de los otros restos de Asn en el hC10.2. El aumento de la desamidación de este péptido se correlaciona con una reducción en la actividad de unión contra el péptido doble fosforilado y sugiere una relación mecanicista entre la desamidación y la Cl50. Esta observación también sugiere que el cambio de los restos Asn 32 y/o 34 en hC10.2 LC podría reducir la desamidación en estos sitios.

25 En el análisis de las variantes, está claro que la simple modificación de la Asn32 por Ser o Gln evita completamente la reacción de desamidación en la Asn34 (Figura 20). Además, no detectamos ninguna desamidación de Gln32 en variantes con esta mutación.

Desamidación a pH bajo

30 En este estudio, se analizó hC10.2 de la misma manera que se ha descrito anteriormente para el estudio de estabilidad a 40 °C. Solo en este caso se utilizó una mezcla de tripsina y Lys-C (producto de Promega) para optimizar la escisión en los restos de lisina. No se observaron sitios adicionales o grados de desamidación y nuevamente los péptidos más prominentes fueron LC-T2, HC-T25 y HC-T36. Además, no se observó ningún cambio en la Cl50 en las muestras tratadas con pH bajo.

Análisis SEC

35 El nivel de agregación fue inferior al 3 % en todas las preparaciones y no se observó ningún cambio en el grado de agregación durante 28 días a 40 °C.

Ejemplo 9

Aislamiento de semillas de tau de ratones rTg4510

40 Los ratones rTg4510 son doblemente transgénicos al coexpresar la tau 4R0N con la mutación P301L en el gen MAPT humano cadena abajo de una construcción de elemento respondedor-operón de tetraciclina (TRE) y una construcción activadora, que consiste en el sistema de expresión génica condicional de tetraciclina (tTA). La mutación P301L es una mutación dominante que produce demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17). En ratones rTg4510, la expresión de Tau P301L induce patología de tau, incluida la formación de pre-ovillos y ovillos neurofibrilares (ONF), pérdida neuronal y anomalías del comportamiento en función de la edad. Los ONF son agregados de tau intraneuronales constituidos por filamentos helicoidales emparejados (PHF), cintas retorcidas o filamentos rectos, son insolubles en detergente y contienen predominantemente tau hiperfosforilada. La hiperfosforilación significa que la tau se fosforila en más sitios que la tau del cerebro adulto sano y que para un sitio determinado se fosforila un porcentaje mayor de lo normal de moléculas de tau (>8 moles de fosfo/mol de tau). La distribución anatómica de los ONF es la señal histopatológica post mortem que se correlaciona con el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (EA) y con la pérdida de memoria en el envejecimiento normal y el deterioro cognitivo leve. El patrón de distribución de ONF en el cerebro de los pacientes con EA es muy jerárquico y se ha dividido en seis etapas. La invasión gradual del cerebro por cambios de ONF también se ha confirmado bioquímica y se ha clasificado en diez etapas según la región afectada. La caracterización bioquímica de las diferentes especies de tau de cerebros con EA se basó originalmente en un protocolo de fraccionamiento utilizando

sarkosyl al 1 % para el aislamiento de tau insoluble. Basándose en este método, las especies de tau hiperfosforiladas insolubles en sarkosyl aisladas en la fracción de sedimento insoluble en sarkosyl (P3) se definen como PHF-tau y se consideran el equivalente bioquímico de los ONF. Las especies de tau hiperfosforiladas solubles en tampón aisladas en la fracción soluble (S1) se definen como especies de tau de oligómeros no fibrilares y se consideran el equivalente bioquímico de tau de los pre-ovillos. En los ratones rTg4510, la tau transgénica 4R0N humana fosforilada y no fosforilada de monómero normal está presente en la fracción soluble (S1) y se visualiza como una especie de tau de 55 kDa en la SDS PAGE. La tau 4R0N hiperfosforilada con mutación P301L se presenta como tau con movilidad desplazada de 64 kDa y 70 kDa en la fracción soluble (S1), y exclusivamente en el precipitado soluble en solución salina tamponada con Tris (TBS) (S1p) y el sedimento insoluble en sarkosyl (P3). Las especies de tau de 64 kDa y 70 kDa insolubles en sarkosyl aisladas en P3 son fibrillas de tau (PHF-tau) y el equivalente bioquímico de los ONF. Las especies de tau de 64 kDa y 70 kDa solubles en tampón en S1 y enriquecidas en la fracción de precipitado soluble en TBS (S1p) son tau oligoméricas y el equivalente bioquímico de tau en los pre-ovillos. Las especies de tau de 70 kDa son específicas para el mutante P301L y también se encuentran en el cerebro de los pacientes con FTDP-17. Se homogeneizó tejido cerebral de ratones rTg4510 de 40 semanas de edad en 10 volúmenes de TBS que contenían 15 Tris/HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 274 mM y KCl 5 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 27.000 x g durante 20 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (S1) y fracciones de sedimento (P1). La fracción S1 extraíble con TBS se separó mediante centrifugación a 150.000 x g durante una hora a 4 °C en las fracciones de sobrenadante (S1s) y precipitadas (S1p). El sedimento de S1p se resuspendió en Tris/HCl 10 mM [pH 8,0] hasta un volumen equivalente a una quinta parte del volumen de S1 original. El sedimento de P1 se volvió a homogeneizar en 5 volúmenes de tampón con alto contenido de sal/sacarosa (NaCl 0,8 M, Sacarosa al 10 %, Tris/HCl 10 mM, [pH 7,4]) y se centrifugó a 27.000 x g durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron y se incubaron con sarkosyl (concentración final 1 %; Sigma) durante una hora a 37 °C, seguido de centrifugación a 150.000 x g durante una hora a 4 °C para obtener sedimentos insolubles en sarcosilo, que se denominan fracción P3. El sedimento de P3 se resuspendió en Tris/HCl 10 mM [pH 8,0] hasta un volumen equivalente a la mitad del volumen original usado para los homogeneizados de cerebro. La tau patológica de cerebro de ratón rTg4510 caracterizada como tau hiperfosforilada de 64 y 70 kDa en SDS-PAGE estaba presente exclusivamente en las fracciones S1p y P3 como oligómero soluble en TBS y tau de fibrillas insolubles en sarkosyl, respectivamente. Las fracciones de S1s contienen tau normal no fosforilada y fosforilada presentada como tau de 55 kDa en SDS-PAGE. La tau patológica, las fibrillas oligoméricas solubles y las fibrillas insolubles aisladas en las fracciones S1p y P3 respectivamente, se emplearon como semillas de tau hiperfosforiladas para reclutar la tau humana monomérica endógena en inclusiones de tau agregada y para inducir la siembra de tau en cultivos corticales primarios aislados de ratones rTg4510.

Ensayo de siembra en cultivo neuronal primario aislado de ratones rTg4510

Se aislaron neuronas corticales murinas (CTX) de embriones de ratón rTg4510 del día E14-16. Se aparearon ratones transgénicos simples con activador tTA con ratones transgénicos simples con respondedor a tau mutante. Las hembras preñadas se sacrificaron 14-16 días después de la concepción y los embriones se genotiparon con ADN cerebral utilizando el par de cebadores 5'-GATTAACAGCGCATTAGAGCTG-3' y 5'-GCATATGATCAATTCAAGGCCGATAAG-3' para el transgén activador tTA y 5'-TGAACCAGGATGGCTGAGCC-3' y 5'-TTGTCATCGCTTCCAGTCCCCG-3' para el transgén respondedor de tau mutante mientras que las cortezas embrionarias aisladas se mantuvieron en Hibernate E sin cloruro de calcio (BrainBits LLC) a 4 °C. Se seleccionaron cortezas de embriones de ratón rTg4510 y se pusieron neuronas disociadas en placas recubiertas de poli-L-lisina a 100 µg/ml a una densidad de 0,13 x 106 células/cm² (420.000 células/ml, 100 µl/pocillo, placa de 96 pocillos) y se cultivaron en medio Neurobasal acondicionado con glía complementado con un suplemento de B-27 al 2 % con antioxidantes, L-glutamina 0,5 mM, penicilina a 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml (todas las soluciones de Gibco-BRL Invitrogen). El medio Neurobasal acondicionado con glía se generó mediante cultivos de astrocitos murinos primarios confluentes y no proliferativos después de 24 h de incubación. Las neuronas se suministraron a los 4 días *in vitro* (DIV) reemplazando la mitad del medio con medio Neurobasal fresco acondicionado con glía y, posteriormente, se realizó el suministro cada siete días. En DIV4, después del suministro, el cultivo neuronal se trató con arabinósido de citosina 1 µM para detener la proliferación de las células. La proporción de células gliales en los cultivos fue inferior al 10 %, según lo evaluado por un anticuerpo contra la proteína glía-fibrilar-ácida (GFAP) en DIV15. Las CTX de ratones rTg4510 expresan tau murina endógena y tau humana transgénica 4R0N. Las CTX de ratones rTg4510 contienen solo tau monomérica humana normal no fosforilada y fosforilada presentada como bandas de tau de 55 kDa en SDS-PAGE; no están presentes especies de tau hiperfosforiladas (64 y 70 kDa) en CTX sin tratamiento previo de ratones rTg4510. En DIV7 se indujo la siembra de tau incubando CTX con semillas de tau patológica, tau hiperfosforilada de fibrillas oligoméricas solubles o insolubles aislada en fracciones S1p y P3 respectivamente. Se introdujo un cambio de medio completo en DIV11 para evitar la captación continua de semillas de tau patológica y se midió la siembra de tau en las CTX en DIV15. La siembra de Tau se caracterizó por el reclutamiento de tau humana soluble monomérica en inclusiones de tau agregada e hiperfosforilada mostradas como bandas de tau con movilidad desplazada a un peso molecular más alto de 64, 70 y 140 kDa SDS-PAGE. Tanto las semillas de tau hiperfosforilada, como las fibrillas oligoméricas solubles o insolubles de las fracciones S1p y P3, respectivamente, indujeron la siembra de tau igualmente en las CTX. Para investigar el efecto de los anticuerpos tau sobre la siembra de tau, se trataron CTX con una mezcla de 0,1 µl de fracción P3 o 0,2 µl de fracción S1p (que contenían 0,2 ng de tau humana total) aisladas de ratones rTg4510 de 40 semanas y 10 µg de anticuerpo (hC10.2, hC10.2_N32S, hC10.2_A101T_N32S, control de IgG humana) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La mezcla de anticuerpo-semilla de tau se preincubó durante 2 h a 4 °C antes de la adición a las CTX. En DIV11 se realizó un cambio completo de medio a medio

Neurobasal fresco acondicionado con glia. En DIV15, las neuronas se lisaron en tampón de lisis de tritón enfriado con hielo (tritón X-100 al 1 % en Tris 50 mM, NaCl 150 mM (pH 7,6) con mezcla de inhibidor de proteasa al 1 % (Roche), cóctel de inhibidor de fosfatasa I y II (Sigma) al 1 % y Benzonase al 0,2 % (Sigma) con agitación a 200 rpm durante 45 min a 4 °C y se utilizaron lisados en el ensayo de agregación de Cisbio *in vitro*, y el contenido de proteína se determinó mediante el ensayo de ácido bicinconílico (BCA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo de agregación de tau de Cisbio se basa en la fluorescencia resuelta en el tiempo utilizando el mismo anticuerpo para el anticuerpo donante (conjugado Tb3+) y aceptor (conjugado d2) en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron 9 µl de muestra con 9 µl de mezcla de anticuerpos y la mezcla se incubó durante 20 h. La placa se leyó en un lector de placas Pherastar para evaluar la fluorescencia resuelta en el tiempo (señal FRET medida/integrada después de encender la luz de excitación). El ensayo mide la agregación de tau, tanto de oligómeros de tau como de fibrillas, en material cerebral de ratones rTg4510 y en lisados neuronales de CTX sembradas con tau aisladas de embriones rTg4510 con una alta especificidad y sensibilidad. Los resultados pueden verse en la Figura 21. La incubación de semillas de P3 o S1p con anticuerpo de control de IgG humana condujo a una señal de agregación de tau de CTX sembradas similar a la incubación de semillas de P3 o S1p con PBS. Las señales de PBS y del anticuerpo de control de IgG humana se promediaron y se establecieron como el 100 % de agregación de tau. Los anticuerpos tau hC10.2, hC10.2N32S y hC10.2A101T-N32S redujeron significativamente las señales de agregación de tau tanto de la siembra de tau inducida con P3 como de la inducida por S1p en DIV15. Se resumieron los resultados de 2 experimentos individuales. El anticuerpo hC10.2 redujo la siembra de tau inducida por P3 y S1p en un 23 %. Las variantes hC10.2N32S y hC10.2A101T-N32S redujeron la siembra de tau inducida por P3 y S1p en un 41-53 % y un 48-60 %, respectivamente. Las variantes hC10.2N32S y hC10.2A101T-N32S fueron superiores en comparación con hC10.2 en la disminución de la siembra de tau en CTX procedentes de rTg4510 inducida por semillas de tau hiperfosforiladas de S1p o P3 que consisten en tau oligomérica o en fibrillas, respectivamente.

Ejemplo 10

25 Marcaje de estructuras tau dependiente de la dosis en ratones rTg4510 después de la inyección i.v. de hC10-2_N32S_A101T

Método:

30 Ratones rTg4510 de doce meses de edad. Estos ratones transgénicos expresan Tau humana mutada (P301L 0N4R) bajo un elemento sensible al tet-off en neuronas positivas para CamK2 y muestran una hiperfosforilación de tau pronunciada y formación de ovillos desde los 6 meses de edad en adelante. Además, está presente neurodegeneración a los 12 meses de edad en los ratones rTg4510 en regiones con fuerte patología. Los ratones recibieron una única inyección iv a través de la vena de la cola con anticuerpos hC10-2_N32S a dosis de 80 mg/kg, 20 mg/kg, 8 mg/kg y 0,8 mg/kg. Se inyectó un volumen de 100 microlitros por ratón. Tres días después de la inyección, los ratones se sometieron a perfusiones durante 2 min con PBS seguido de perfusiones de 10 min con paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se crioprotegieron en sacarosa al 30 % y se cortaron en crio secciones de flotación libre de 40 micrómetros. Las secciones se incubaron con suero porcino normal al 5 % en PBS/BSA al 1 %/Tritón X-100 al 0,3 % durante 20 min, se lavaron en PBS y finalmente se incubaron con anticuerpo anti-IgG humana secundario conjugado con AlexaFluor488 a 1:200 (n.º 709-545-149; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA). Las secciones se lavaron en PBS, se montaron y se examinaron por microscopía de fluorescencia.

40 Resultados:

45 La inyección intravenosa de hC10-2_N32S tuvo como resultado la unión *in vivo* a estructuras diana principalmente en el hipocampo y la corteza en cerebros de ratones rTg4510 de edad avanzada (Figura 1). El número de estructuras positivas observado variaba entre los animales rTg4510 individuales. Las señales positivas en los cerebros de rTg4510 no aparecieron rápidamente como tinción intracelular y pueden representar material de tau extracelular liberado durante el proceso de neurodegeneración. Por puntuación semicuantitativa, las señales más altas (intensidad de fluorescencia y número de estructuras positivas) se detectaron en todos los ratones que recibieron dosis de 20 y 80 mg/kg (Tabla 6). Las estructuras marcadas estaban presentes a 8 mg/kg en 3 de 4 ratones, pero a un nivel claramente inferior al de 20 y 80 mg/kg. La inyección intravenosa de 0,8 mg/kg no produjo señales por encima del fondo con el método de visualización aplicado. En conjunto, estos datos sugieren que los anticuerpos hC10-2_N32S, de una manera dependiente de la dosis, son capaces de penetrar en el parénquima cerebral y marcar específicamente dianas en ratones rTg4510 *in vivo*. Figura 22

Tabla 6

Tg4510 de edad avanzada n =	Inyección iv de hC10-2_N32S	Señal fluorescente	Intensidad (relativa a 80 mg/kg)
3	80 mg/kg	+ en 3/3	+++
4	20 mg/kg	+ en 4/4	++++

4	8 mg/kg	+ en 3/4	+
4	0,8 mg/kg	- en 4/4	0

Estructuras tau marcadas con fluorescencia detectadas en secciones de cerebro después de la inyección iv de hC10-2_N32S. Puntuación semicuantitativa: +++ fuerte; ++ moderado; + débil; 0 no detectado.

Ejemplo 11 Patología de la tau de la semilla en tau

Preparación de semillas

- 5 Se obtuvieron muestras de tejido cortical congelado de donantes con EA de Tissue Solutions (Glasgow, Reino Unido). El tejido cerebral se pesó y homogeneizó usando un homogeneizador con cuchillas en PBS frío estéril (10 veces el volumen de muestra de cerebro). A continuación, el homogeneizado se sonó mediante 5 pulsos de 0,9 segundos en un aparato de ultrasonidos Branson en la potencia 2. El homogeneizado se centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se dividió en alícuotas, se congeló de manera inmediata en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su uso.
- 10

Animales utilizados en el estudio

- 15 Se utilizaron ratones transgénicos que expresaban tau humana mutada (P301L 0N4R) bajo un elemento transactivador controlado por tetraciclina en neuronas positivas para CamKII (tg4510). Este modelo normalmente comienza a desarrollar patología de tau a los 3-4 meses de edad. Al suministrar a las madres doxiciclina durante el embarazo y durante las primeras 3 semanas de vida de las crías, la patología se desarrolla en una etapa posterior (a partir de los 6 meses de edad). Los ratones pretratados con doxiciclina utilizados en los estudios tenían 2,5 meses de edad en el momento de la siembra.

Tratamiento con anticuerpos

- 20 Los anticuerpos se prepararon en una concentración de 1,5 mg/ml en PBS estéril y se prepararon alícuotas con suficiente anticuerpo para un punto de tiempo de dosificación. Las alícuotas se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Desde los 2 meses de edad hasta el sacrificio a los 5,5 meses de edad, los ratones recibieron una dosis IP semanal de anticuerpo (15 mg/kg igual a 10 ml/kg). Anticuerpos utilizados: B12-IgG1 humana de control, hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T.

Inyección estereotáctica

- 25 Justo después de recibir la 3^a dosis de anticuerpo, los ratones se anestesiaron mediante inhalación de isoflourano y se fijaron en un marco estereotáctico. Se expuso el cráneo y se ajustó la posición hasta que el bregma y lambda estuvieron nivelados. Se taladró un orificio en el cráneo a una distancia de 2 mm lateral (derecha) y 2,4 mm posterior del bregma. Se utilizó una jeringa de 10 µl con punta biselada (SGE) de calibre 26 para inyectar el material de siembra 1,4 mm ventral a la superficie del cerebro.
- 30 Se infundieron lentamente dos µl de material en el sitio (0,5 µl/min) y la jeringa se dejó a partir de entonces durante 5 minutos más antes de la retracción. La herida se cerró y selló con suturas y los ratones se mantuvieron con calor durante la recuperación de la anestesia. A continuación, los ratones se alojaron durante 3 meses antes de la fijación por perfusión con paraformaldehído al 4 %.

Histología

- 35 Los cerebros fijados se procesaron en Neuroscience Associates (Knoxville, TN) utilizando tecnología MultiBrain®. Se incluyeron conjuntamente hasta 25 cerebros de ratón por bloque y se seccionaron en estado congelado a 35 µm en el plano coronal a través de todo el cerebro. Una de cada 6 secciones se tiñó con la tinción de plata de Gallyas para revelar ovillos neurofibrilares. Las secciones se montaron, se cubrieron con un cubreobjetos y se contaron las neuronas positivas para la tinción de plata de Gallyas (soma) en el lado inyectado de los hipocampos de todos los cerebros. Se incluyeron todas las subregiones del hipocampo. Se contaron ocho secciones por cerebro. Los resultados reflejan la suma de neuronas positivas de las 8 secciones.

Resultados

- 40 hC10-2, hC10-2_N32S y hC10-2_N32S_A101T redujeron significativamente la siembra de ovillos Tau en el hipocampo inyectado (prueba de comparación múltiple de Turkey y anova de un solo factor). hC10-2: 50 %, hC10-2_N32S: 47 % y hC10-2_N32S_A101T: 60 % en comparación con los ratones tratados de control. Figura 23.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> H. Lundbeck A/S

5 <120> Anticuerpos específicos para tau hiperfosforilada

<130> 1049-WO-PCT

10 <160> 57

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 441

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Tau humana

20

<400> 1

Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Met	Glu	Asp	His	Ala	Gly
1					5				10					15	

Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His
			20				25					30			

Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Glu	Ser	Pro	Leu
		35				40					45				

Gln	Thr	Pro	Thr	Glu	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Pro	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser
		50		55				60							

Asp	Ala	Lys	Ser	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Pro	Leu	Val
		65			70			75			80				

Asp	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Gln	Pro	His	Thr	Glu
			85			90					95			

Ile	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro
		100			105						110				

Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val
		115				120				125					

Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly
			130			135			140						

Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro
			145		150				155			160			

ES 2 862 427 T3

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

5 <210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> Residuos tau 386-408 (pS396, pS404)

5 <400> 2
 Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20

10 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2

<400> 3
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Asn
 1 5 10

20 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de C10-2

<400> 4
 Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

30 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de C10-2

<400> 5
 Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
 1 5

40 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de C10-2

50 <400> 6
 Asp Arg Thr Ile His
 1 5

55 <210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de C10-2

<400> 7

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de C10-2

<400> 8

Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 9

<211> 214

<212> PRT

20

<213> Cadena ligera de C10-2 de ratón

<400> 9

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

ES 2 862 427 T3

Asp Ile Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Thr Ser Ile Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 10

<211> 439

5 <212> PRT

<213> Cadena pesada de C10-2 de ratón

<400> 10

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

ES 2 862 427 T3

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

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

Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser
145 150 155 160

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

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
180 185 190

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
210 215 220

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
260 265 270

ES 2 862 427 T3

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
305 310 315 320

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

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
340 345 350

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
355 360 365

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

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385 390 395 400

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

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 11

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado

10

<400> 11

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

ES 2 862 427 T3

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

ES 2 862 427 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 12

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado

10 <400> 12

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

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

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

ES 2 862 427 T3

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55E

10

<400> 13

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glv Gln Glv Leu Glu Trp Ile

ES 2 862 427 T3

35	40	45	
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr			
100	105	110	
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro			
115	120	125	
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val			
130	135	140	
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala			
145	150	155	160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
165	170	175	
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly			
180	185	190	
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
195	200	205	
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys			
210	215	220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	

ES 2 862 427 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 14

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55Q

10 <400> 14

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

ES 2 862 427 T3

50

55

60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

ES 2 862 427 T3

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 15

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55S

10

<400> 15

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gln Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tvr

ES 2 862 427 T3

65

70

75

80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

ES 2 862 427 T3

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 16

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S

10

<400> 16

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Met Ala Thr Tvr Tvr Cys Leu Gln His Thr Tvr Leu Pro Phe

ES 2 862 427 T3

85

90

95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q

10

<400> 17

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

ES 2 862 427 T3

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N34S

10

<400> 18

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 862 427 T3

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N34Q

10

<400> 19

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

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

Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 20

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S, N34S

10

<400> 20

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glv Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 862 427 T3

35	40	45
Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe		
85	90	95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 21		
<211> 214		
5	<212> PRT	
<213> Artificial		
<220>		
<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q, N34S		
10	<400> 21	
Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln		
20	25	30

ES 2 862 427 T3

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 22

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q, N34Q

10 <400> 22

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

ES 2 862 427 T3

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

Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 23

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S, N34Q

10 <400> 23

ES 2 862 427 T3

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

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

Leu Gln Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante A101T

10 <400> 24

ES 2 862 427 T3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

ES 2 862 427 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 25

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55E, A101T

10 <400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

ES 2 862 427 T3

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

ES 2 862 427 T3

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 26

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55Q, A101T

10

<400> 26

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg

ES 2 862 427 T3

20

25

30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

ES 2 862 427 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 27

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55S, A101T

10

<400> 27

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 862 427 T3

35	40	45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr		
100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
115	120	125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
145	150	155
160		
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly		
180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
195	200	205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285

ES 2 862 427 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 28

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55E

10

<400> 28

Tyr Ile Tyr Pro Gly Glu Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 29

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CDR2 de cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55Q

<400> 29

Tyr Ile Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly Arg

25 <210> 30

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

5 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de C10-2 humanizado, variante D55S

<400> 30
 Tyr Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

10 Gly Arg
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S

<400> 31
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Asn
 20 1 5 10

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q

30 <400> 32
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Gln
 1 5 10

<210> 33
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N34S

40 <400> 33
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Ser
 1 5 10

<210> 34
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N34Q

<400> 34
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Asn Leu Gln
 1 5 10

55 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S, N34S
 1 <400> 35
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Ser
 1 5 10
 10 <210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q, N34S
 15 <400> 36
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Ser
 1 5 10
 20 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32Q, N34Q
 30 <400> 37
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Gln Leu Gln
 1 5 10
 35 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera de C10-2 humanizado, variante N32S, N34Q
 40 <400> 38
 Gln Ala Ser Gln Asp Thr Ser Ile Ser Leu Gln
 1 5 10
 45 <210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de C10-2 humanizado, variante A101T
 50 <400> 39
 Arg Gly Thr Met Asp Tyr
 1 5
 55 <210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> IMGT C10.2 LC CDR1
 60 <400> 40

Gln Asp Thr Ser Ile Asn
 1 5
 <210> 41
 <211> 3
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> IMGT C10.2 LC CDR2
 10 <400> 41
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 42
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> IMGT C10.2 LC CDR3
 <400> 42
 Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
 1 5
 25 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> IMGT C10.2 HC CDR1
 <400> 43
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr
 1 5
 35 <210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> IMGT C10.2 HC CDR2
 <400> 44
 Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr
 45 1 5
 <210> 45
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> IMGT C10.2 HC CDR3
 55 <400> 45
 Ala Arg Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 46
 <211> 6
 60 <212> PRT

5 <213> Artificial
 <220>
 <223> IMGT N32S/ N32S,A101T LC CDR1
 10 <400> 46
 Gln Asp Thr Ser Ile Ser
 1 5
 15 <210> 47
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> IMGT N32S/N32S,A101T LC CDR2
 <400> 47
 Gly Ala Ser
 1
 25 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> IMGT N32S/N32S,A101T LC CDR3
 <400> 48
 Leu Gln His Thr Tyr Leu Pro Phe Thr
 1 5
 35 <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR1
 <400> 49
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg Thr
 1 5
 45 <210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR2
 <400> 50
 Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr
 1 5
 55 <210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> IMGT A101T/N32S,A101T HC CDR3
 <400> 51

Ala Arg Arg Gly Thr Met Asp Tyr
 1 5

 5 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Chotia C10.2 /N32S HC CDR1

 10 <400> 52
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 1 5

 15 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Chotia C10.2/N32S HC CDR2

 20 <400> 53
Tyr Pro Gly Asp Gly Ser
 1 5

 25 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Chotia C10.2/N32S HC CDR3

 30 <400> 54
Arg Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5

 35 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Chotia A101T/N32S,A101T HC CDR1

 40 <400> 55
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Arg
 1 5

 45 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Chotia A101T/N32S,A101T HC CDR2

 55 <400> 56
Tyr Pro Gly Asp Gly Ser
 1 5

 60 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Chotia A101T/N32S,A101T HC CDR3

5

<400> 57

Arg Gly Thr Met Asp Tyr

1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que comprende

- (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y
 - (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**, o
- 5 (a) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y
- (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

2. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende

- (a) una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y
- (b) una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 11**.

10 3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende

- (a) una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y
- (b) una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 24**.

15 4. El anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de una tauopatía seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de granos argirofílicos (EGA), psicosis, particularmente psicosis debida a EA o psicosis en pacientes con EA, apatía debida a EA o apatía en pacientes con EA, síntomas psiquiátricos de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy, parálisis supranuclear progresiva (PSP), demencia frontotemporal (DFT o variantes de la misma), LCT (lesión cerebral traumática, aguda o crónica), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick, tauopatía primaria relacionada con la edad (PART, por sus siglas en inglés), demencia senil con predominio de ovillos neurofibrilares, demencia pugilística, encefalopatía 20 traumática crónica, accidente cerebrovascular, recuperación de un accidente cerebrovascular, neurodegeneración en relación con la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo ligado a un cromosoma, enfermedad de Lytico-Bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomatosis, parkinsonismo postencefalítico, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Huntington, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz y lipofuscinosis.

25 5. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 4 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1

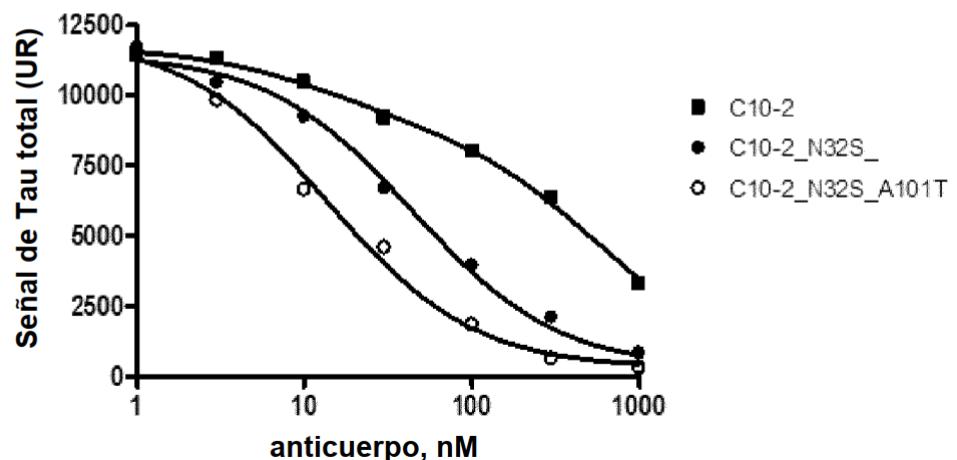


Figura 2

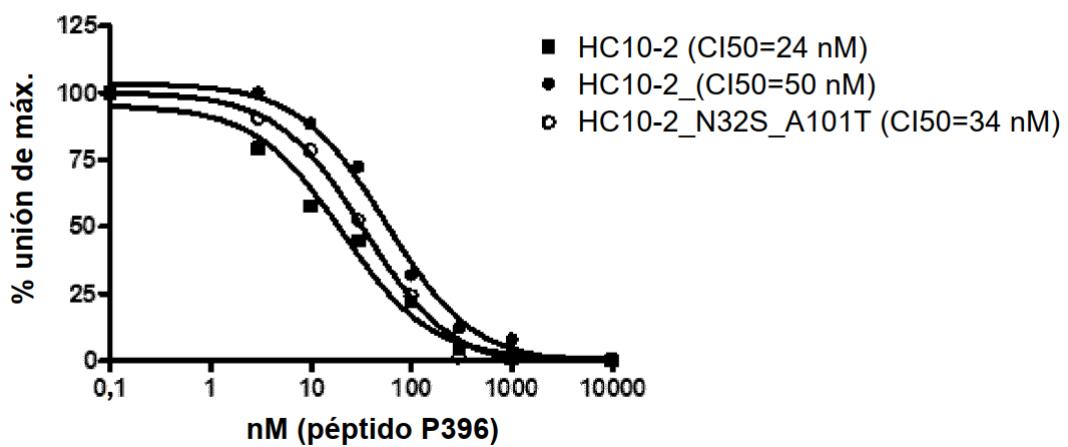


Figura 3

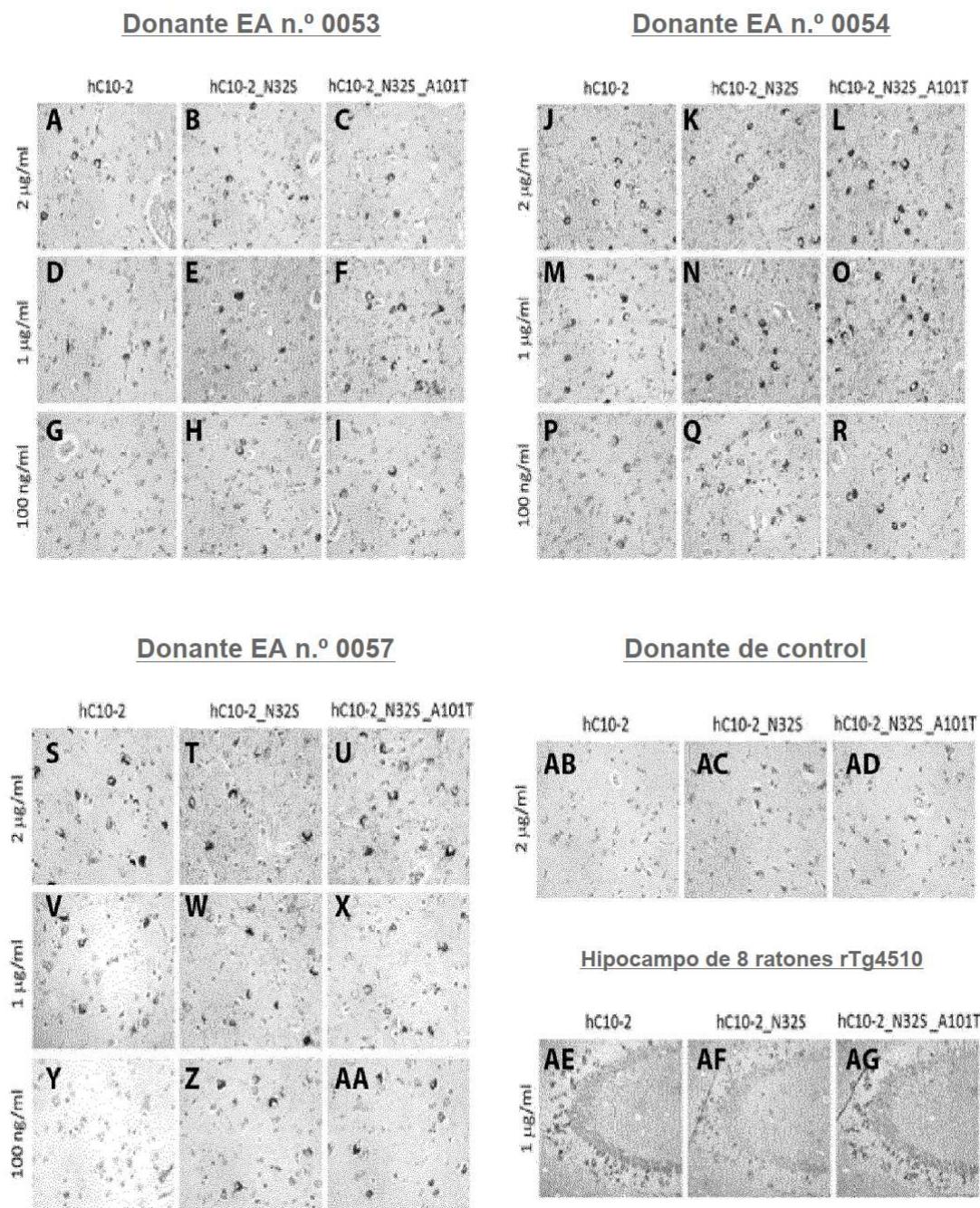


Figura 4

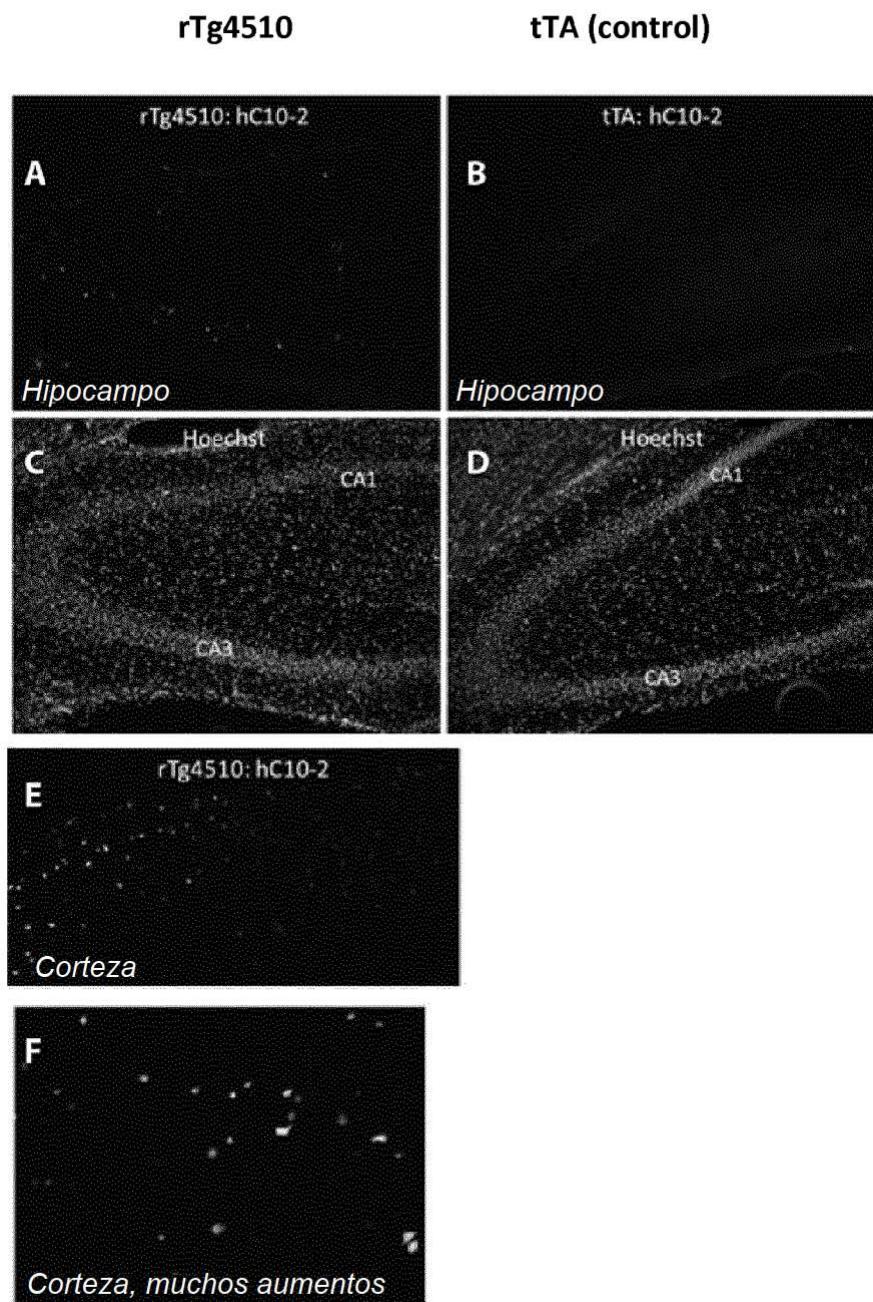


Figura 5

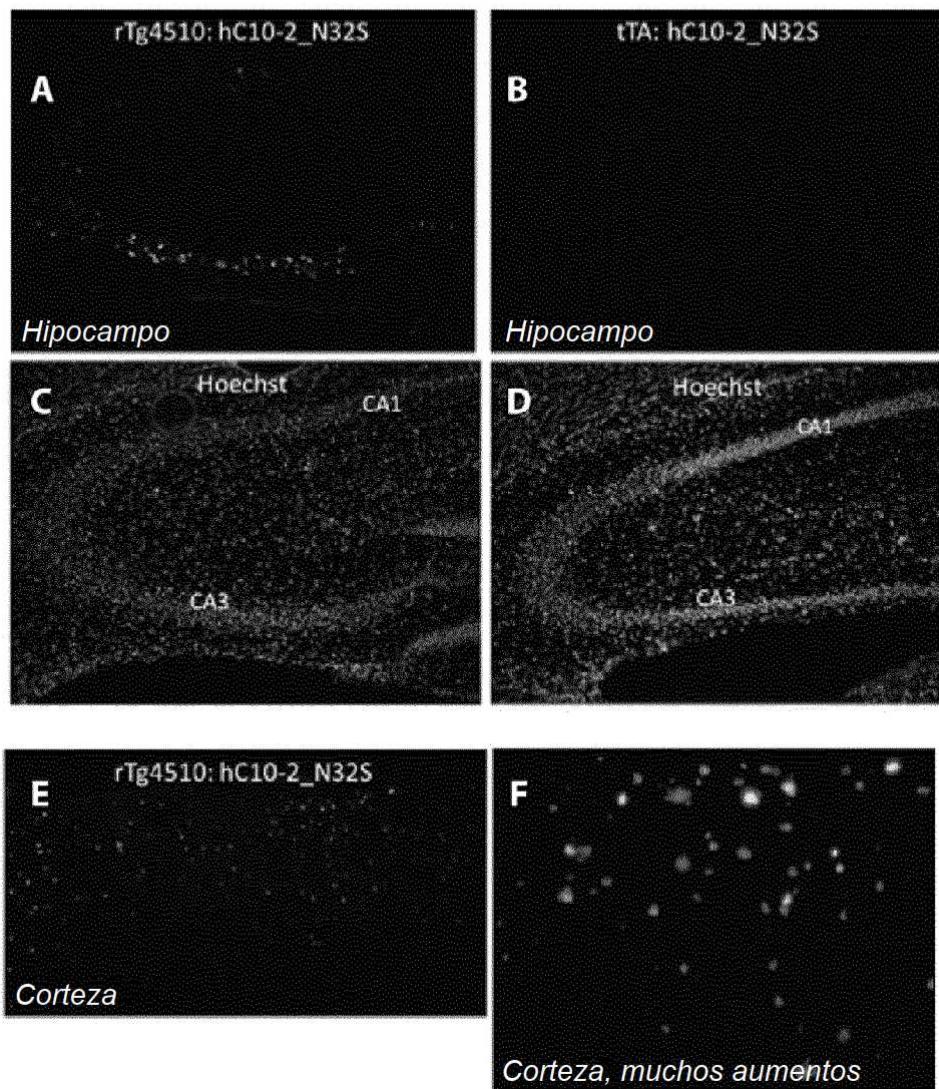


Figura 6

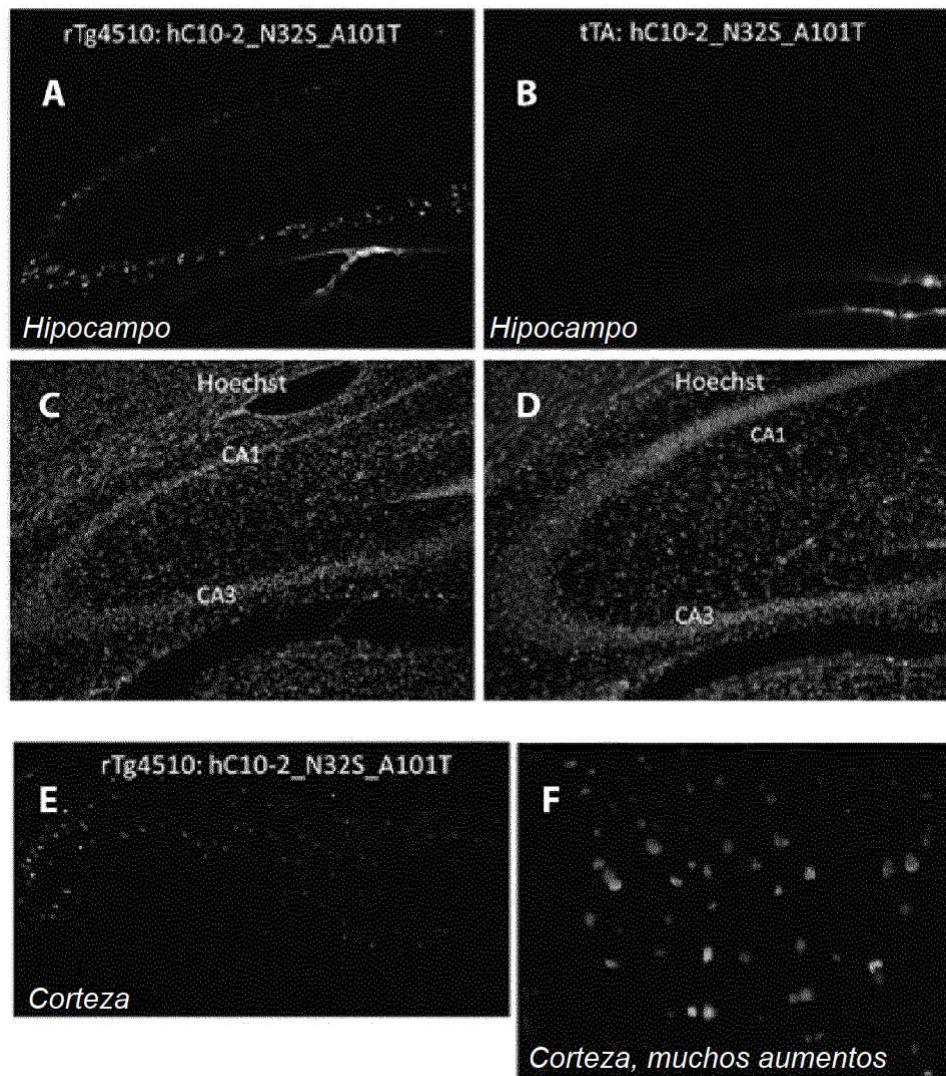


Figura 7

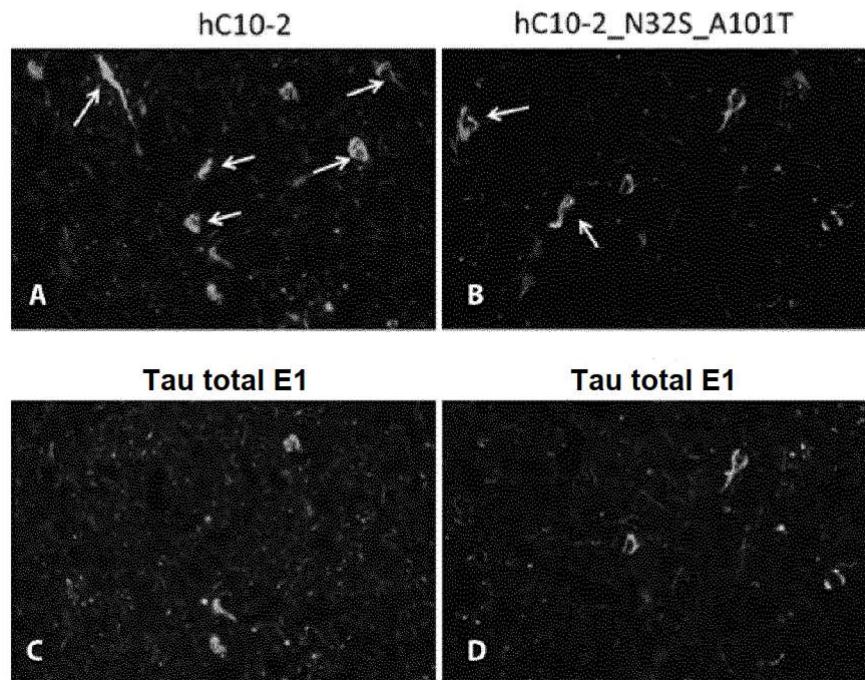


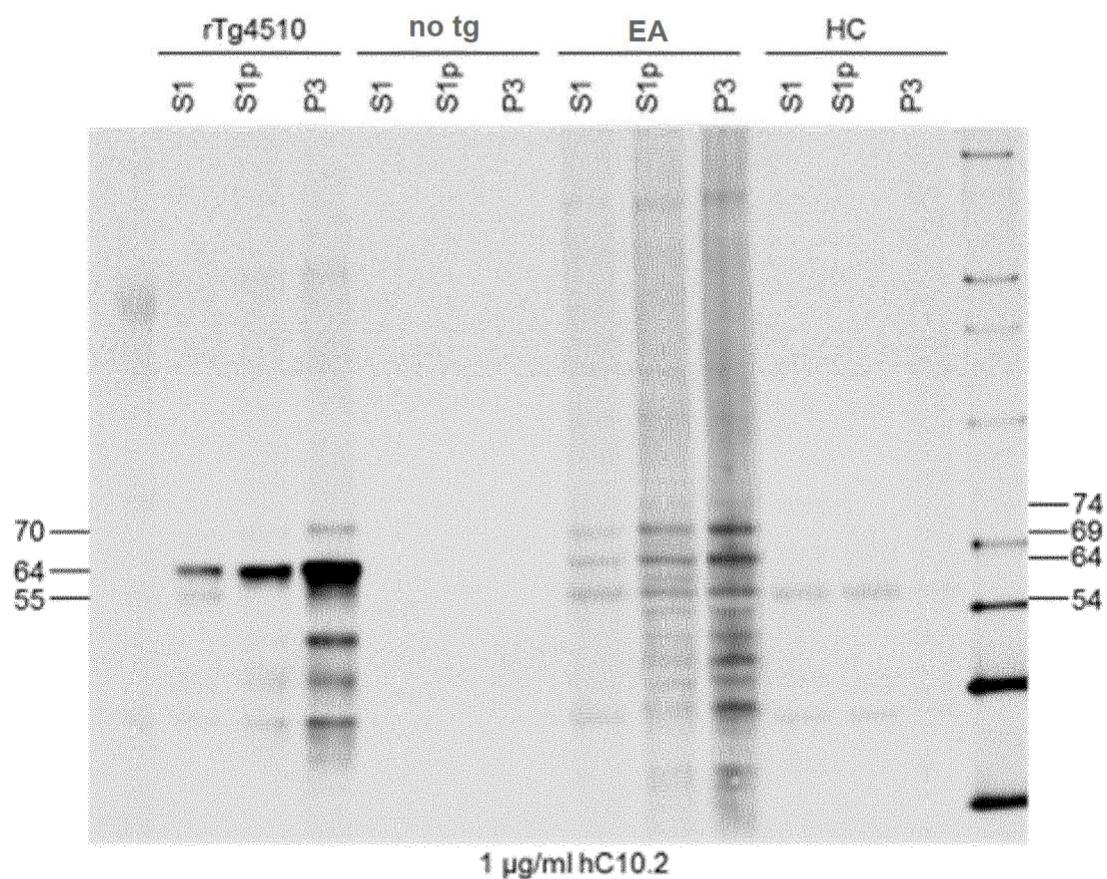
Figura 8A

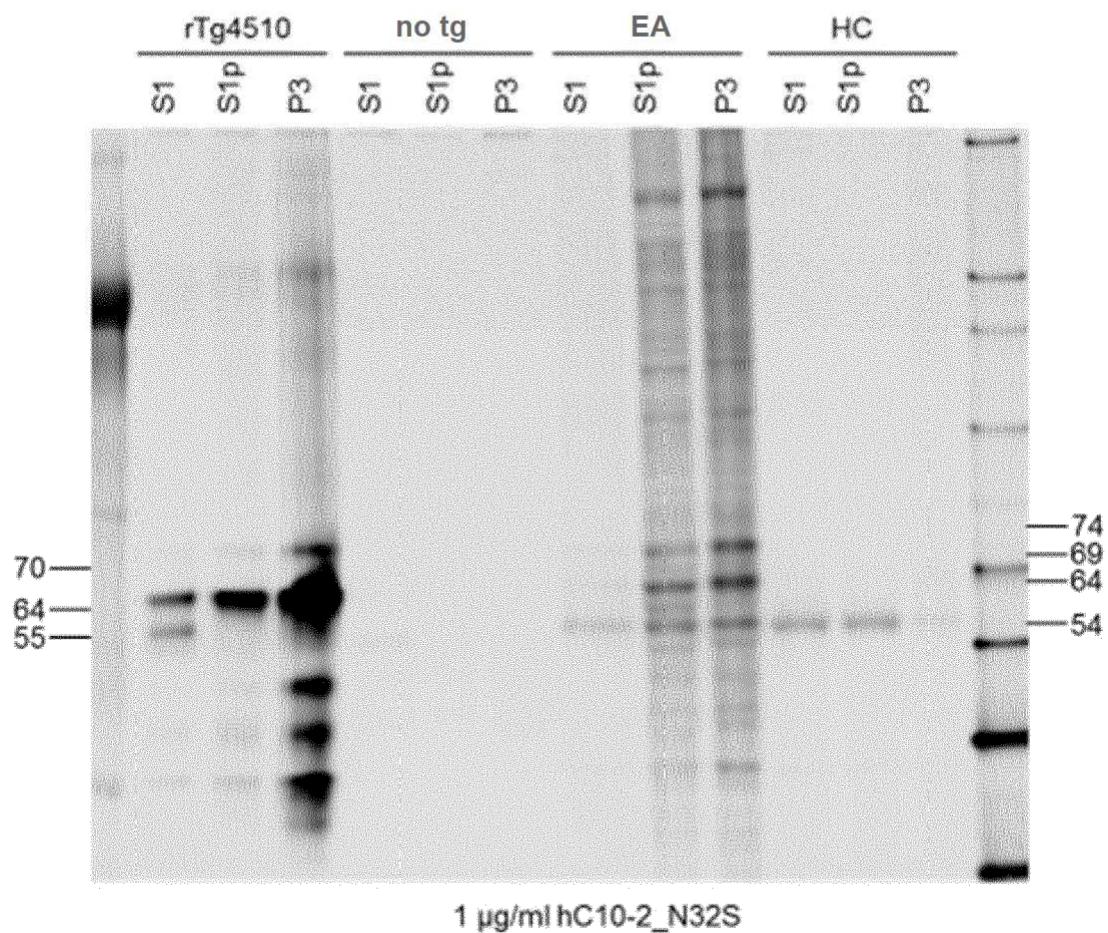
Figura 8B

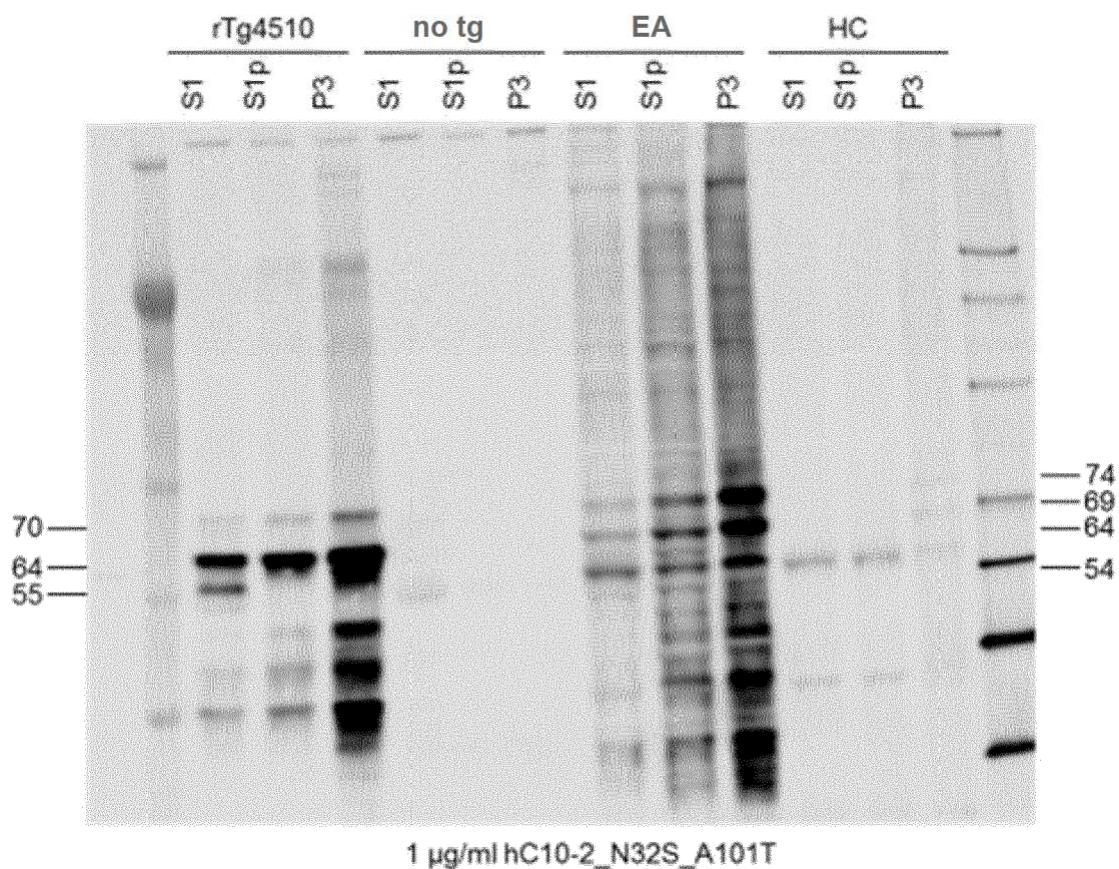
Figura 8C

Figura 9

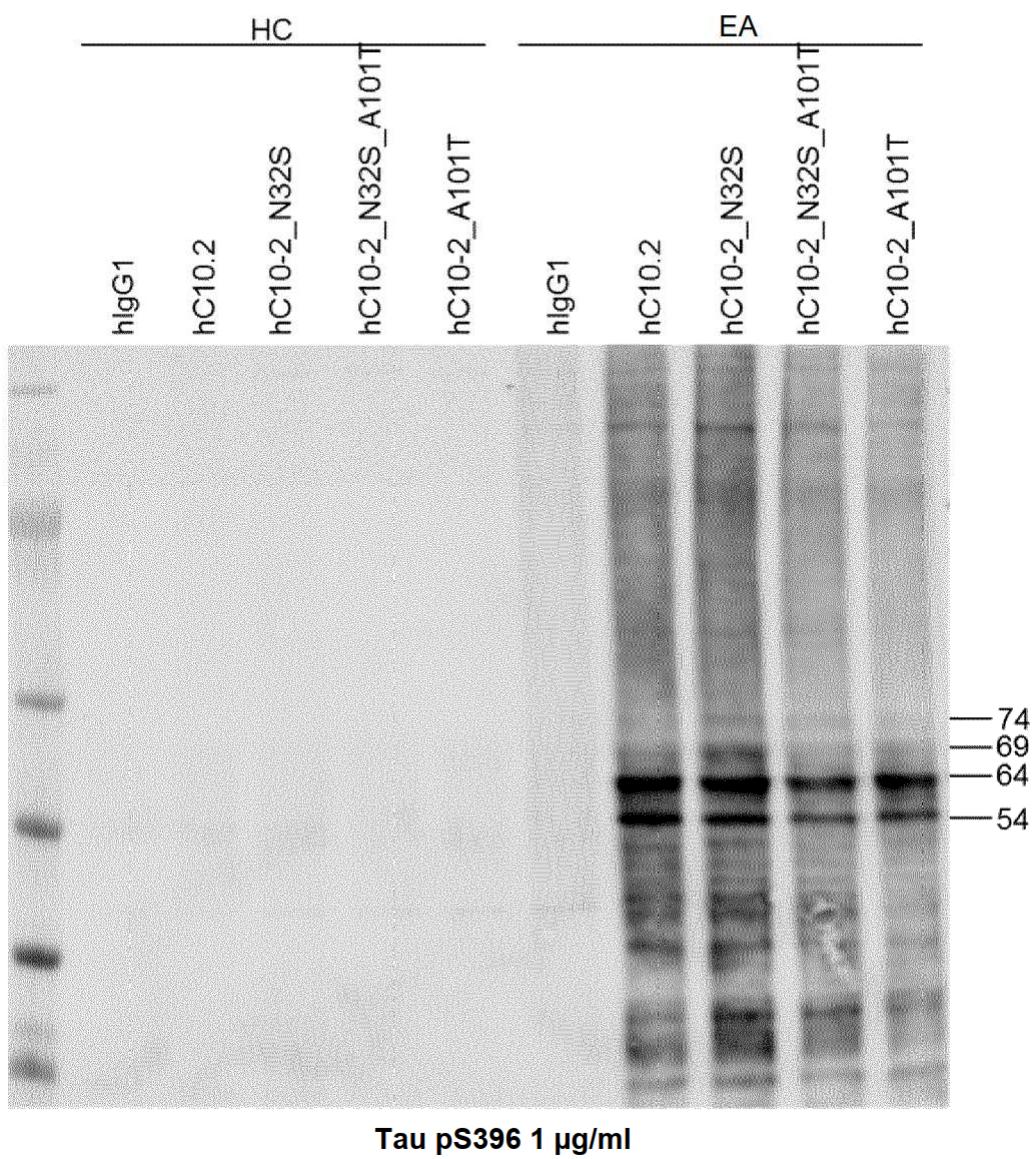


Figura 10 A

A

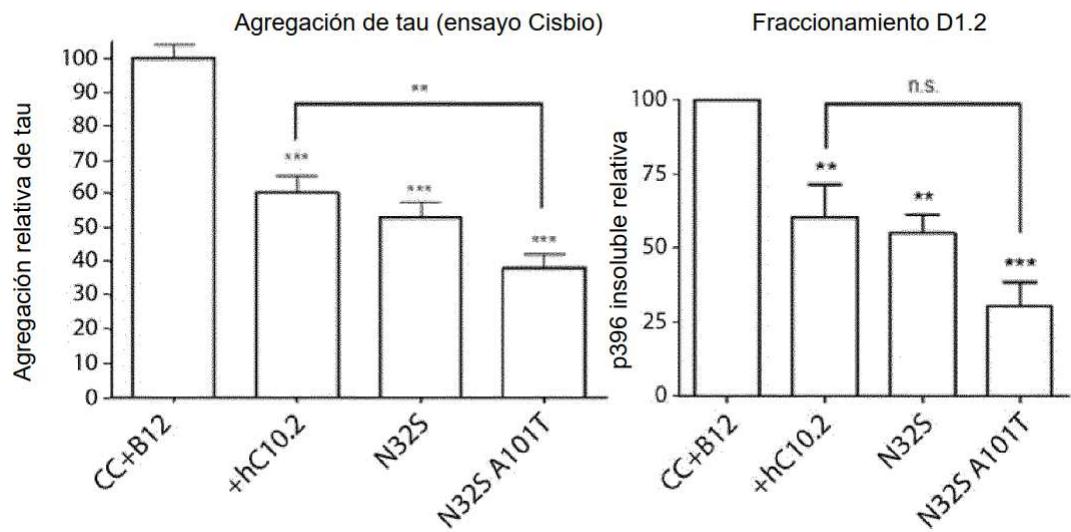
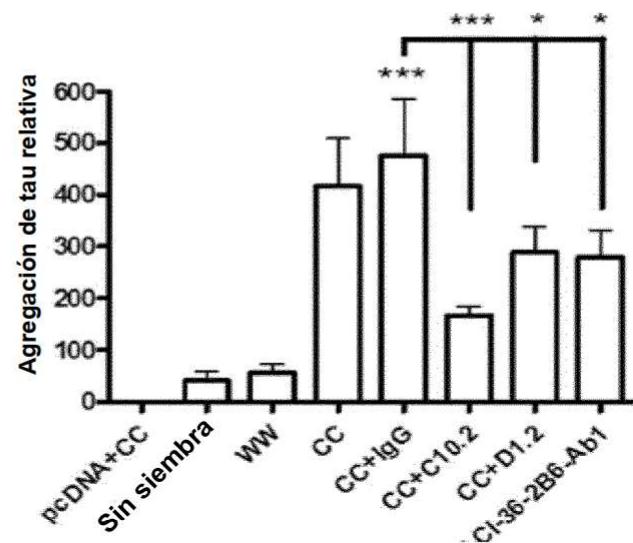


Figura 10 B y 10 C

B



C

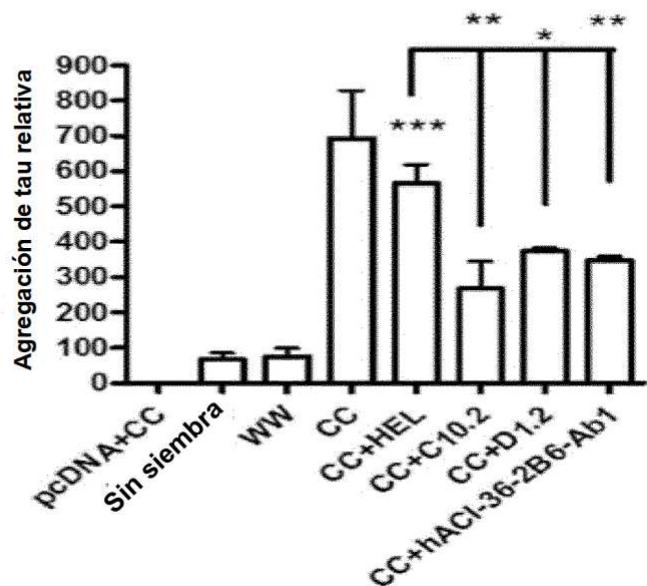


Figura 11

Tau total que queda después del inmunoempobrecimiento

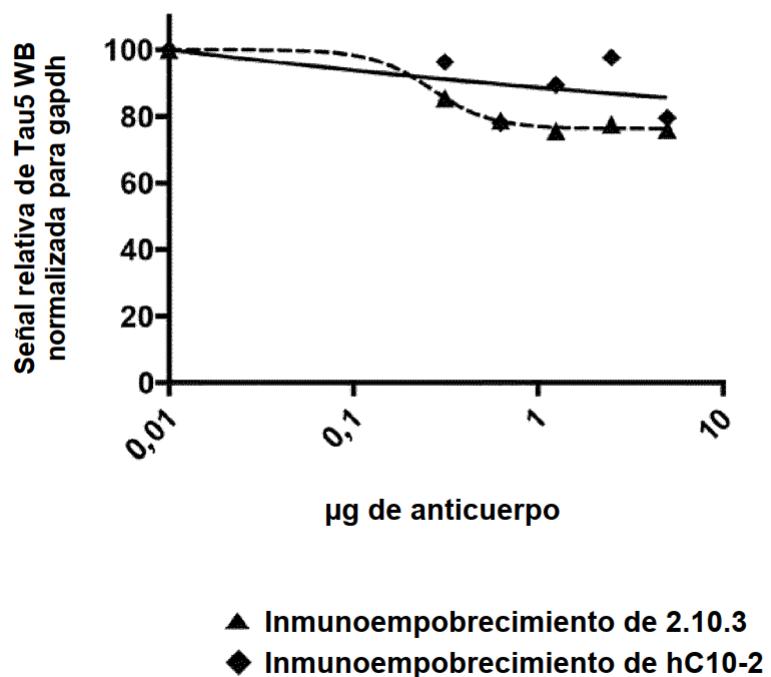


Figura 12

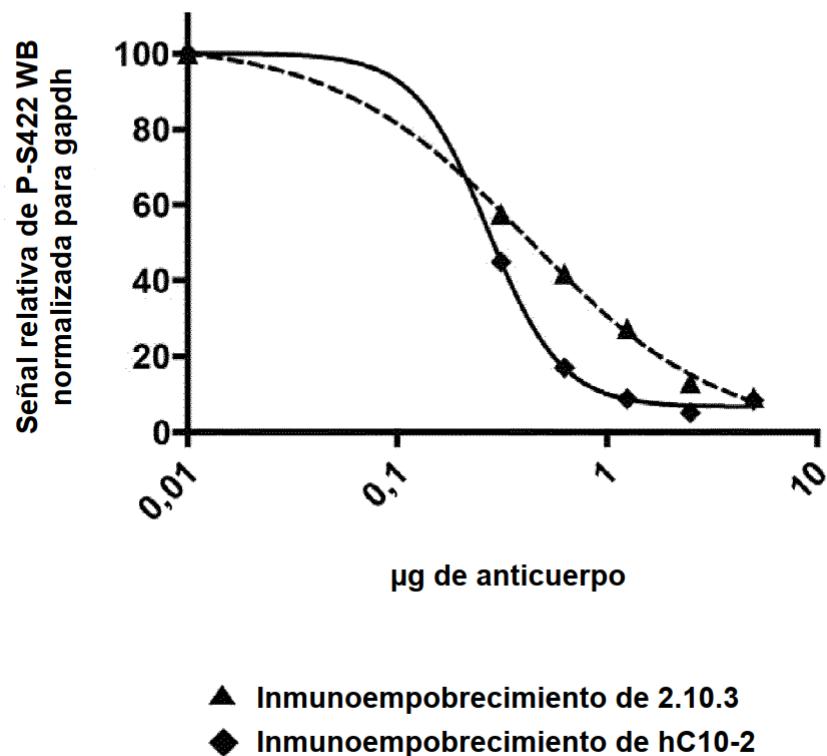


Figura 13

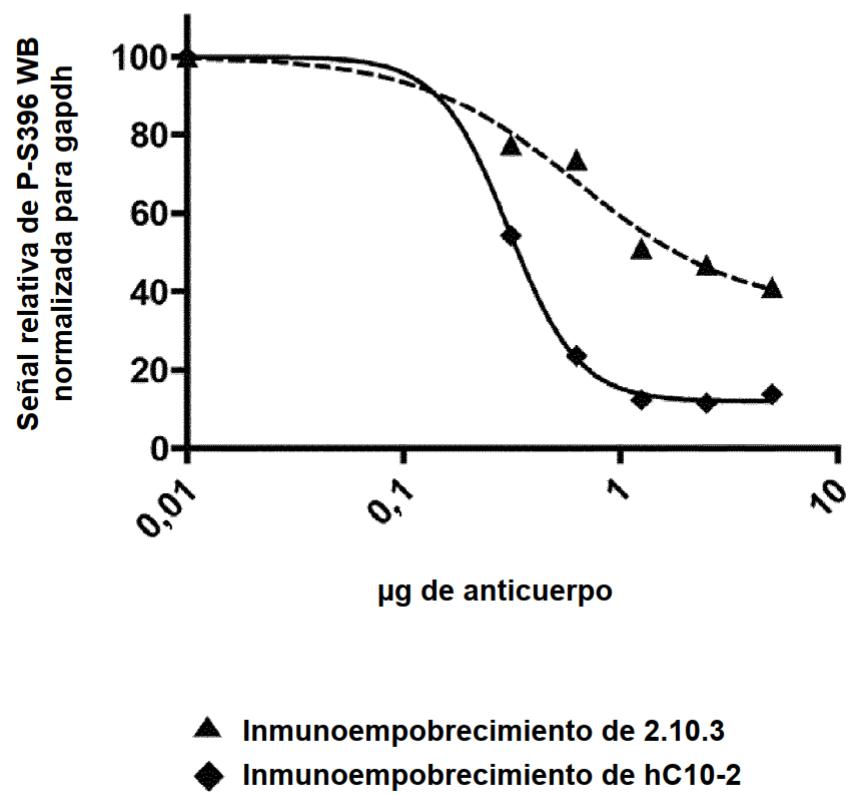


Figura 14

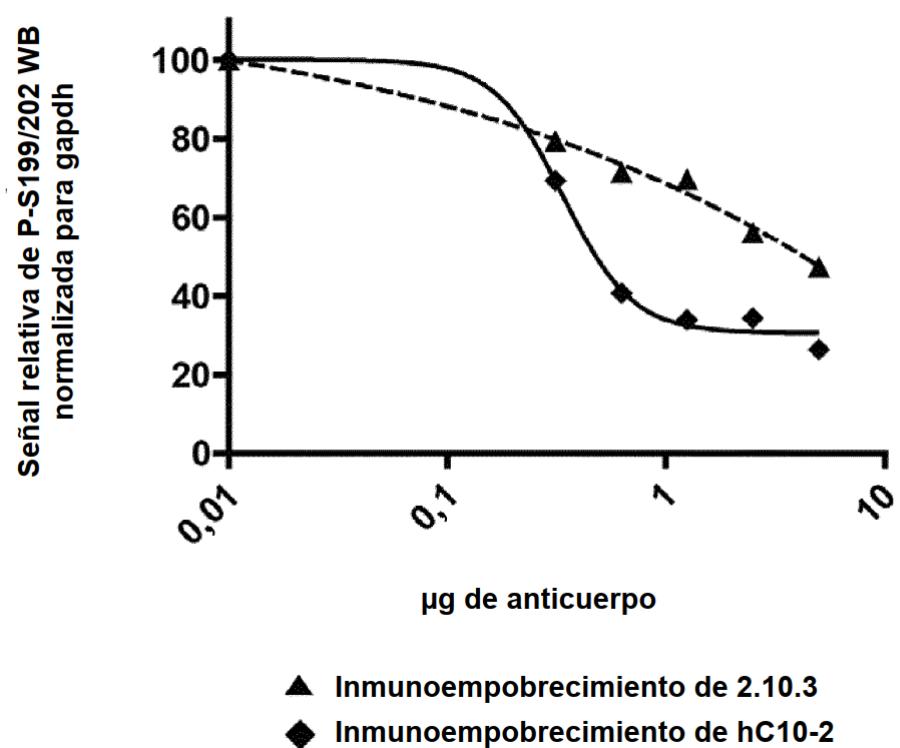


Figura 15

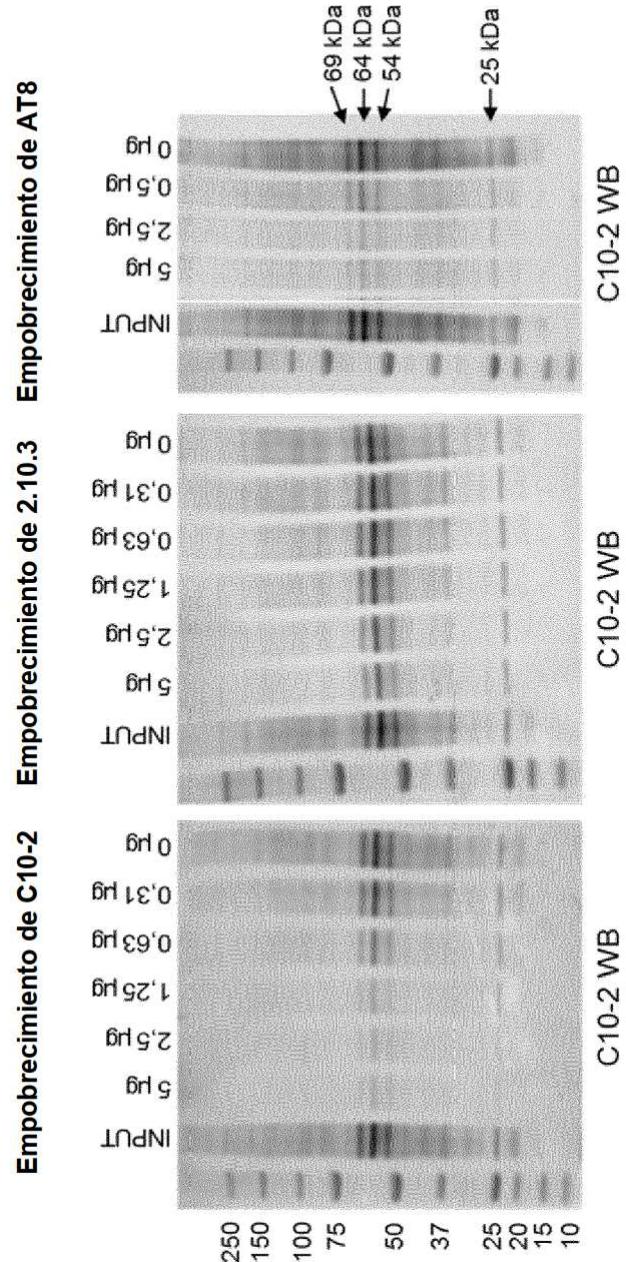


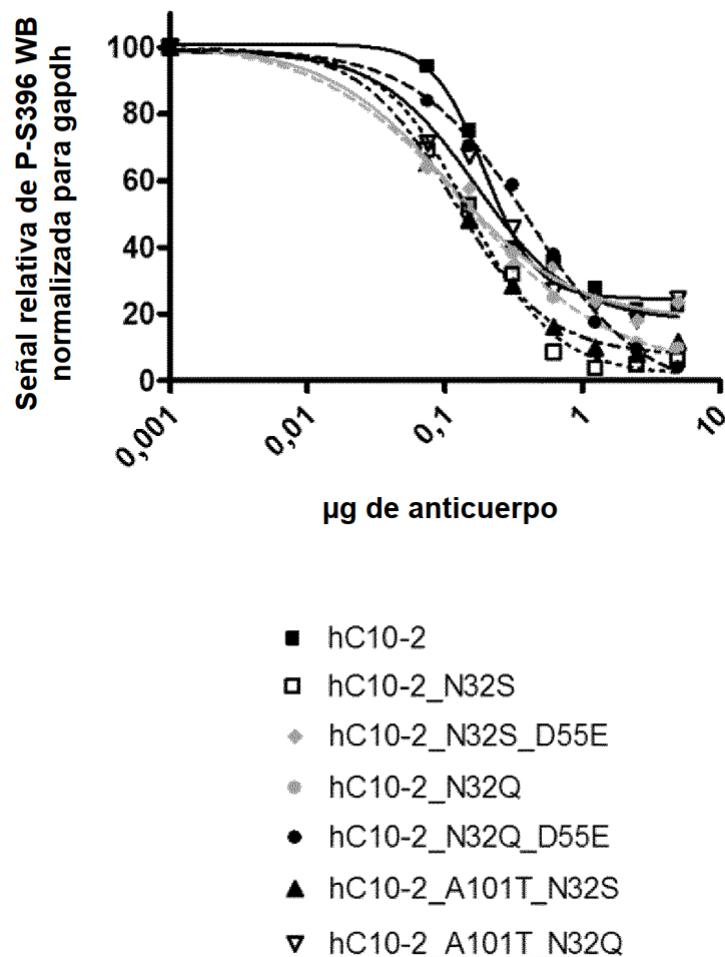
Figura 16

Figura 17

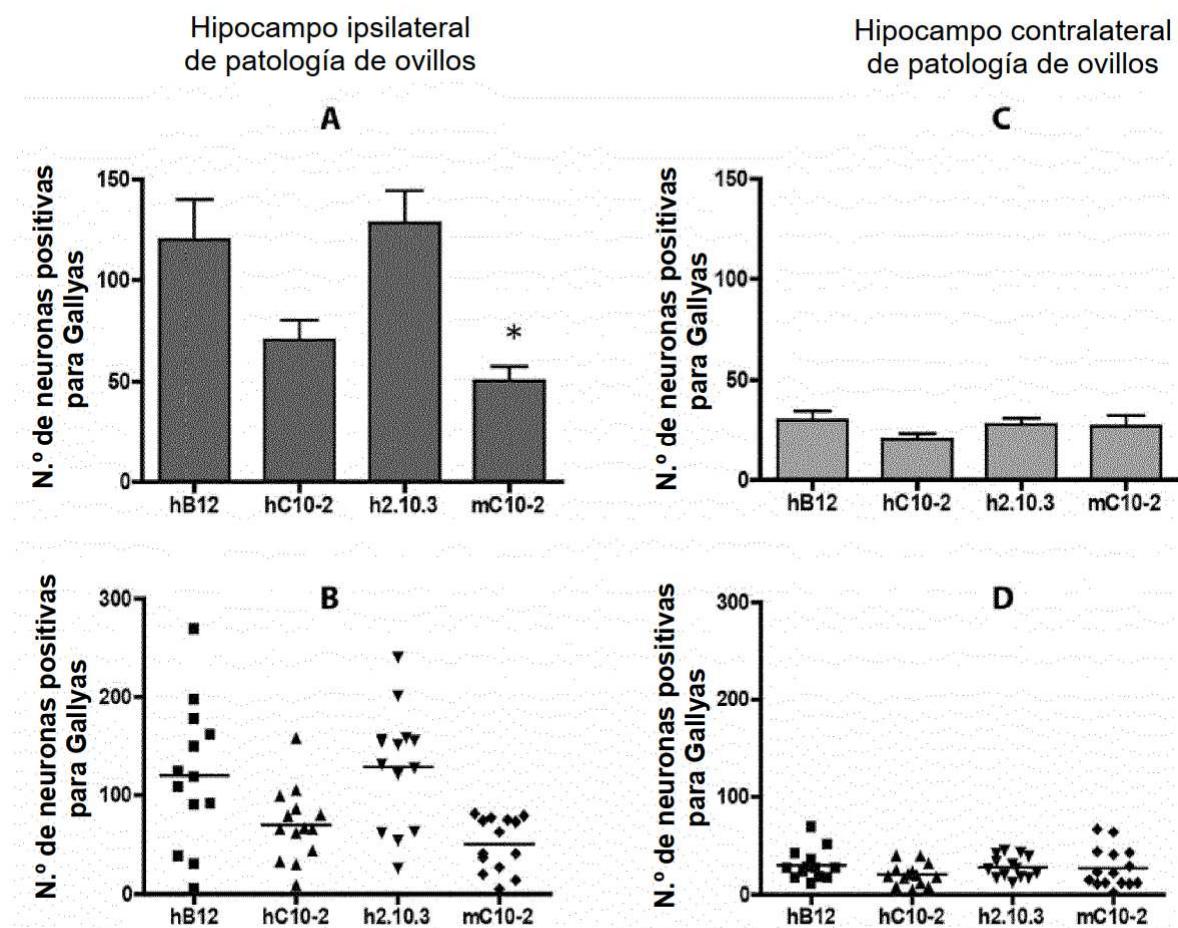


Figura 18

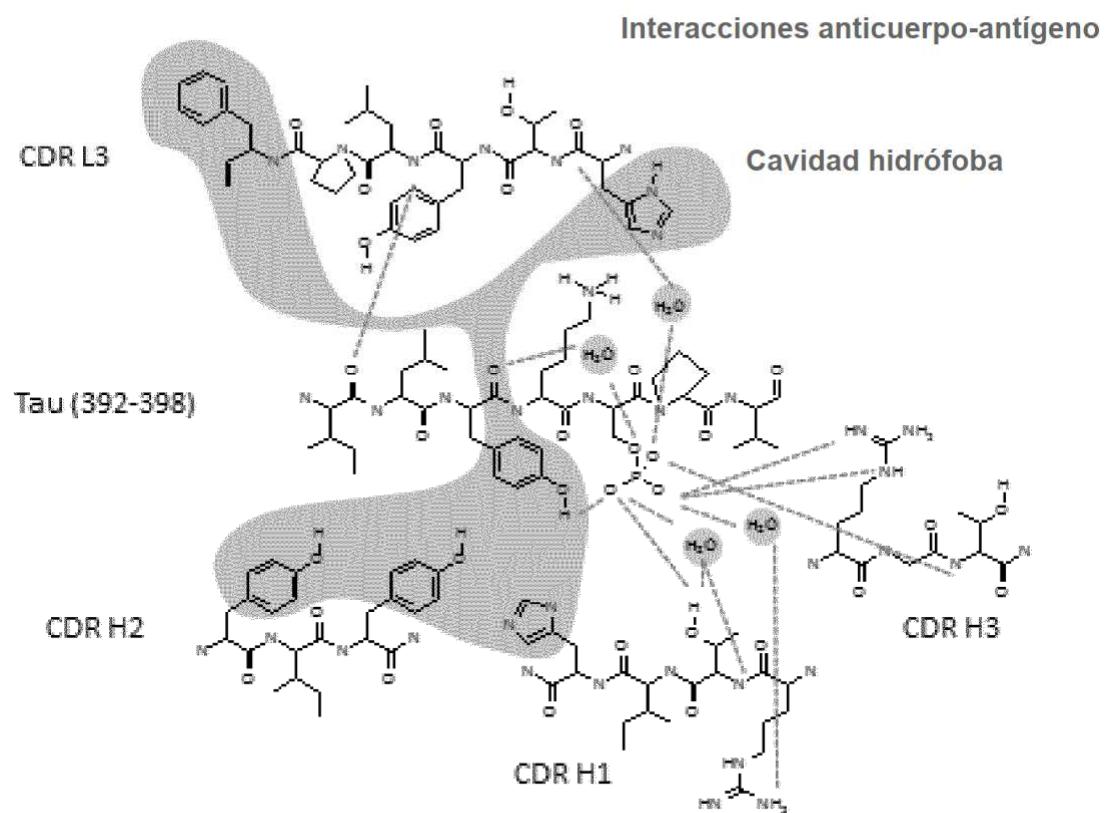


Figura 19

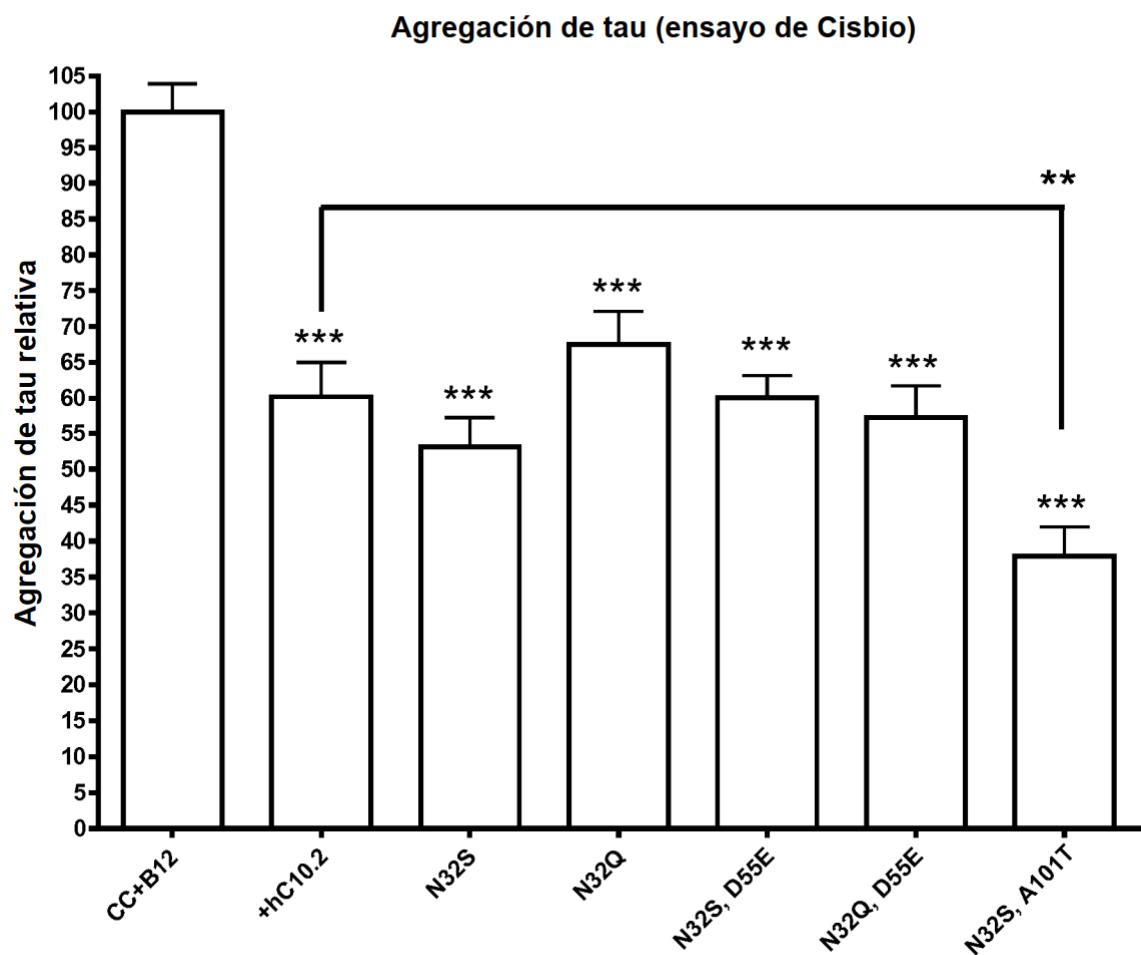


Figura 20

Variante	% péptido LC:T2 desamidado (28 días a 40 °C)
D55E N32Q	0
wt	50
D55E N32S	0
D55E	40
N32Q	0
N32S	0
A101T N32Q	0
A101T N32S	0
A101T	93

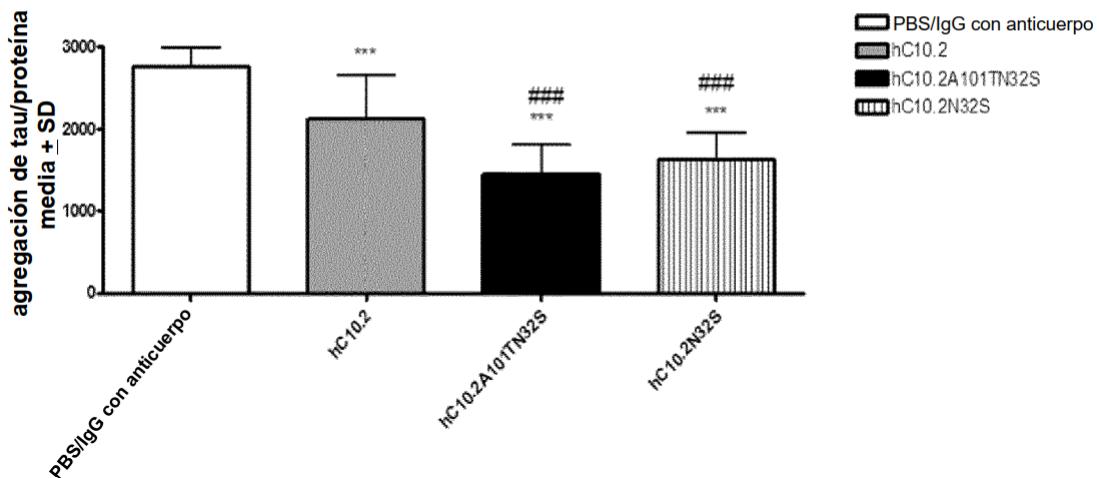
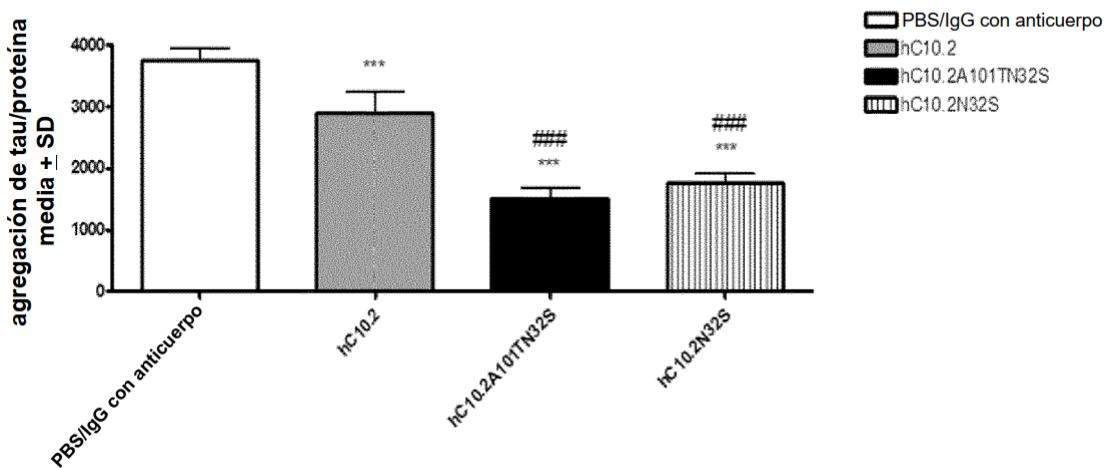
Figura 21**Siembra inducida por P3****Siembra inducida por S1p**

Figura 22

Corteza cingulada

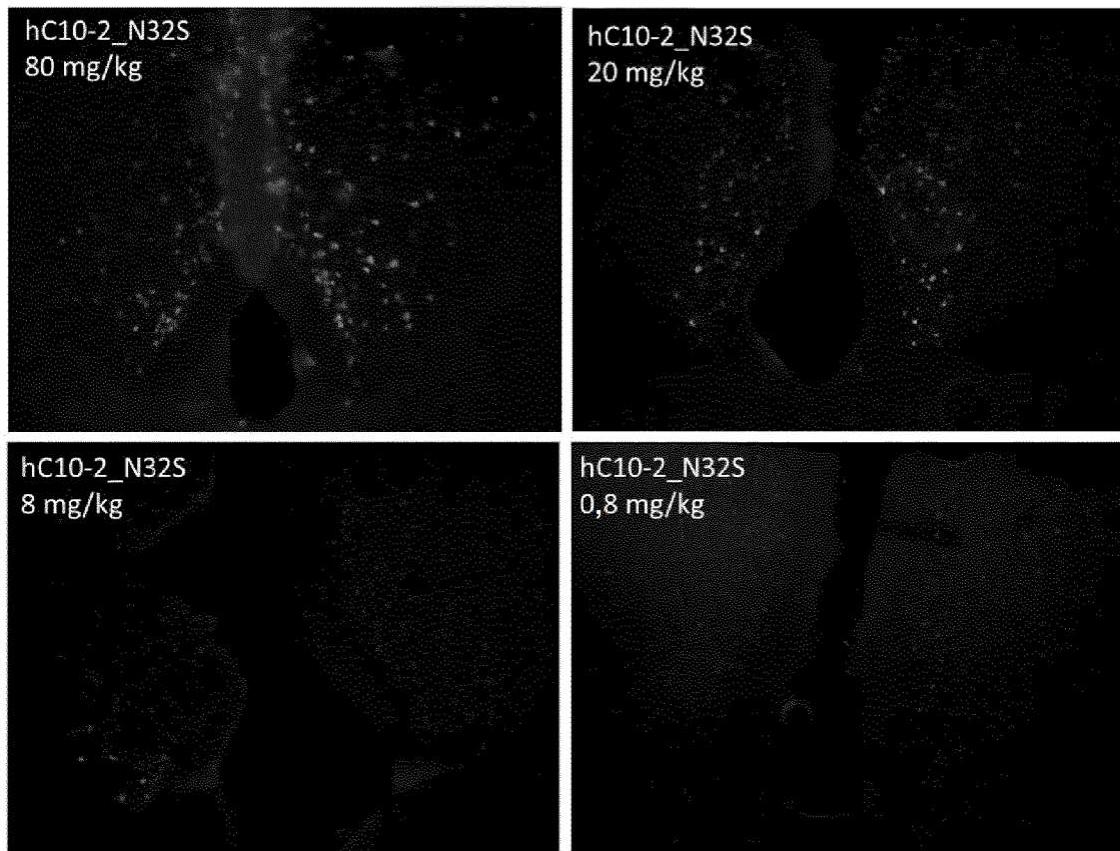


Figura 23

