

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 263**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2017** **PCT/US2017/064869**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018** **WO18106781**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2017** **E 17817624 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3551220**

54 Título: **Anticuerpos anti-Tau y métodos de uso**

30 Prioridad:

07.12.2016 US 201662431180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.05.2025

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.00%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US y
AC IMMUNE SA (50.00%)

72 Inventor/es:

ADOLFSSON, OSKAR;
HOTZEL, ISIDRO y
DICARA, DANIELLE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 3 021 263 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 anti-Tau y métodos de uso

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/431.180, presentada el 7 de diciembre de 2016.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos antiTau y sus métodos de uso.

Antecedentes

15 Los ovillos neurofibrilares e hilos del neurópilo (NT, por sus siglas en inglés) son las principales características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los NT están compuestos por la proteína Tau asociada a microtúbulos sometida a modificaciones postraduccionales, incluida la fosforilación, y se desarrollan debido a la agregación de conformémeros de Tau hiperfosforilada. La EA comparte esta patología con muchas tauopatías neurodegenerativas, 20 en especial con ciertos tipos de demencia frontotemporal (DFT). La proteína Tau parece tener una incidencia fundamental en la pérdida cognitiva en la EA y en las tauopatías neurodegenerativas relacionadas.

25 Los enfoques terapéuticos dirigidos hacia la proteína Tau son pocos y comprenden principalmente a los inhibidores de las quinasas que se cree que aumentan la fosforilación de Tau hasta niveles patológicos y compuestos que bloquean la agregación citoplásmica de la proteína Tau hiperfosforilada. Estos enfoques presentan diversas desventajas de especificidad y eficacia. Existe la necesidad de contar con agentes terapéuticos adicionales que se dirijan hacia los conformémeros de proteínas patológicas que se sabe o se presume que causan trastornos neurodegenerativos.

30 Los documentos WO2012045882, WO2013050567 y WO2013151762 se refieren a anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a los conformémeros patológicos fosforilados de la proteína tau, y a su uso en el tratamiento de tauopatías. El documento WO2016196726 describe anticuerpos anti-Tau y métodos de uso de los mismos. El documento WO2015200806 describe un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a tau. El documento WO2015200806 describe métodos de prevención o tratamiento de una tauopatía 35 en un sujeto, que comprenden la administración de uno o más anticuerpos o fragmentos descritos en dicho documento. El documento WO2013096380 describe anticuerpos anti-PHF-tau y métodos de preparación y uso de los mismos. Los documentos WO2014028777 y WO2014200921 describen anticuerpos anti-Tau para su uso en el tratamiento de una tauopatía. Esteves-Villanueva et al. "Electrochemical detection of anti-tau antibodies binding to tau protein and inhibition of GSK-3 catalysed phosphorylation" se refiere a la inhibición de proteínas quinasas para reducir la toxicidad 40 de tau y a métodos para su medición. Patterson et al., "characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease", se refiere a la determinación de la composición de los ovillos neurofibrilares. El documento WO2013007839 describe anticuerpos anti-tau y métodos para la detección de tau agregada.

Compendio

45 La invención se refiere a anticuerpos antiTau y métodos para utilizarlos. En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos con afinidad elevada con respecto a Tau humana y de mono cynomolgus. En algunas modalidades, los anticuerpos tienen una afinidad con respecto a la Tau humana de menos de 1 nM o menos de 0,5 nM o menos de 0,3 nM, según la medición, por ejemplo, en resonancia de plasmones superficiales.

50 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a la Tau humana, en el que el anticuerpo comprende HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 605; HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 606; HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 607; HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 608; HVR-L2 que comprende 55 una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 609 y HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 610.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

- 60 a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 603;
- b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 604;
- c) una VH como en (a) y una VL como en (b);
- 65 d) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 614;

- e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 615;
- f) una VH como en (d) y una VL como en (e);
- g) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 619;
- h) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 620;
- i) una VH como en (g) y una VL como en (h);

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

- a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 603;
- b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEC ID NO: 604;
- c) una VH como en (a) y una VL como en (b);
- d) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 614;
- e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 615;
- f) una VH como en (d) y una VL como en (e);
- g) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 619;
- h) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 620;
- i) una VH como en (g) y una VL como en (h).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 603 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 604, (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 614 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 615 o (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 620.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613, (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618 o (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se

proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG1 o un anticuerpo de IgG4. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG4. En algunas realizaciones de ese tipo, el anticuerpo comprende las mutaciones M252Y, S254T y T256E. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente invención, el anticuerpo puede comprender una mutación S228P. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el anticuerpo puede comprender las mutaciones S228P, M252Y, S254T y T256E. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG4 que comprenda las mutaciones S228P, M252Y, S254T y T256E. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de IgG4 que comprenda las mutaciones S228P, M252Y, S254T y T256E y que carezca de la lisina de extremo C (des-k) de la región constante de cadena pesada. La lisina de extremo C de la región constante de cadena pesada puede ser eliminada, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo, de modo tal de no codificar la lisina de extremo C.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a cada una de Tau monomérica, Tau fosforilada, Tau no fosforilada y Tau oligomérica con una K_D de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM o menos de 1 nM. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a Tau de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a Tau monomérica humana y/o Tau monomérica de mono cynomolgus con una K_D de menos de 1 nM.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado, en el que el ácido nucleico aislado codifica un anticuerpo descrito en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora, en la que la célula hospedadora comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo descrito en la presente. En algunas realizaciones, se proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo.

En algunas realizaciones, se proporciona un inmunoconjugado, en el que el inmunoconjugado comprende un anticuerpo aislado descrito en la presente y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo etiquetado, que comprende un anticuerpo descrito en la presente y una etiqueta detectable.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo aislado descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo descrito en la presente para su uso como un medicamento. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo descrito en la presente para su uso en el tratamiento de una tauopatía en un individuo. En algunas realizaciones, la tauopatía es una tauopatía neurodegenerativa. En algunas realizaciones, la tauopatía se selecciona de entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt–Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann–Sträussler–Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, de esclerosis lateral amiotrófica/ complejo parkinsonismo–demencia de Guam, enfermedad de las neuronas motoras distinta a Guam con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo en relación con el cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden–Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann–Pick tipo C, degeneración palido–ponto–nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, parkinsonismo posencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, la tauopatía es enfermedad de Alzheimer o parálisis supranuclear progresiva.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado descrito en la presente para su uso en la conservación o aumento de la capacidad de memoria cognitiva o en la desaceleración de la pérdida de memoria en un individuo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método *in vitro* para detectar ovillos neurofibrilares, hilos del neutrófilo o neuritis distrófica, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo descrito en la presente. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra cerebral, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de sangre.

En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, un uso puede comprender administrar un anticuerpo descrito en la presente en combinación con por lo menos una terapia adicional. Los ejemplos no limitativos de terapias adicionales incluyen fármacos neurológicos, corticosteroides, antibióticos, agentes antivirales y otros agentes terapéuticos. Dichos agentes terapéuticos adicionales incluyen, meramente a título enunciativo, otros anticuerpos antitau, anticuerpos contra beta amiloide, anticuerpos contra beta-secretasa 1 («BACE1») e inhibidores de beta-secretasa 1.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A-1F. Se comparó la unión de anticuerpos a Tau hiperfosforilada (pTau) con Tau no fosforilada, utilizando un ensayo ELISA. Los resultados se expresan en densidades ópticas (D.O.).

Figura 2A-2E. Se evaluó la unión de anticuerpos a Tau oligomérica, utilizando un ELISA de captura de oligo– y monotau. Los resultados se expresan en densidades ópticas (D.O.).

Figura 3. Los tres anticuerpos panTau analizados muestran unión a Tau soluble en lisados cerebrales de enfermedad de Alzheimer (EA) y coinciden con los donantes de control al utilizar un ensayo de transferencia Western (WB, por sus siglas en inglés). Se procesaron los extractos proteicos de EA y los lisados cerebrales de control y seis isoformas de Tau humana recombinante en SDS–PAGE y las membranas se sometieron a transferencia con tres anticuerpos panTau (37D3–H9, 94B2–C1 y 125B11–H3). Las líneas con muestras de EA se marcaron como AD18, AD24 y AD27 y las líneas con muestras control se marcaron como C25 y C21. Las líneas con seis isoformas de Tau humana recombinante y marcaron como escalera de htai.

Figura 4A-4C. Los anticuerpos panTau muestran unión a Tau soluble en lisados cerebrales de EA y coinciden con donantes de control usando un ELISA de captura de tau. Se muestran los datos para tres anticuerpos pantau, 37D3–H9, 94B2–C1 y 125B11–H3. Los resultados se expresan en densidades ópticas (D.O.), con valores medios $\pm$ SD, N=2.

Figura 5. Sensogramas que muestran la unión de 37D3–H9 como un Fab (panel izquierdo) y como una IgG (panel derecho) al monómero de Tau humana acoplado covalentemente a una superficie de chip Biacore. Se ha aplicado un modelo de unión 1:1 y se muestra como una superposición. El eje x indica tiempo (unidades=segundos). El eje y indica unidades de resonancia (UR).

Figura 6. Sensogramas superpuestos que muestran la unión de muestras de hu37D3–H9.v5 t=0 (panel izquierdo) y t=2 semanas (panel derecho) al monómero de Tau humana a 3, 1, 6, 3, 12, 5, 25, 25, 50 y 100 nM. Se ha aplicado un modelo de unión 1:1 y también se muestra en esta figura. El eje x indica tiempo (unidades=segundos). El eje y indica unidades de resonancia (UR).

Figura 7. Unión de hu37D3–H9.v5 y hu37D3–H9.v5 N28D a Tau monomérica en forma individual (panel izquierdo muestra hu37D3–H9.v5 y el panel del medio muestra hu37D3–H9.v5 N28D) y mezcla a una relación 1:1 (panel derecho). El eje x indica tiempo (unidades=segundos). El eje y indica unidades de resonancia (UR).

Figura 8A-8D. Afinidad, índice de estabilidad y secuencias de las noventa variantes de 37D3–H9 analizadas para determinar la posible mejora de estabilidad. Por cuestiones de claridad, los valores obtenidos con un procesamiento de anticuerpo de control sin tratamiento (hlgG1 hu37D3–H9.v5) al comienzo, a la mitad y al final de cada experimento se muestran en ambas secciones de la tabla.

Figura 9. Modelo estructural de la región Fv 37D3–H9 que muestra las posiciones de los residuos 28 a 33 (motivo NGNTYF) de la cadena ligera y las posiciones relativas de los residuos 28 y 33. Nótese que el residuo 33, mutado en hu37D3.v28.A4 a Leu, no está cerca del residuo Asn–28 inestable. La línea discontinua muestra un enlace de hidrógenos entre los residuos Asn–28 y Tyr–32. Figura generada utilizando el paquete informático MOE (Chemical

Computing Group).

La figura 10 muestra la farmacocinética del anticuerpo anti-Tau 37D3-H9 en ratones, luego de una única inyección intravenosa o intraperitoneal de 10 mg/kg.

La figura 11 muestra la farmacocinética de hlgG4-S228P hu37D3.v28.A4 e hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en monos cynomolgus, después de una única inyección de bolo IV a una dosis de 1 mg/kg.

Figura 12A-12C. Unión de ciertos anticuerpos antiTau a fragmentos de tau. (Fig.12A) Se muestra la unión de ciertos anticuerpos antiTau a fragmentos de Tau 1-15, 10-24, 19-33, 28-42, 37-51 y 46-60. (Fig.12B) Unión del anticuerpo de mlgG2a 37D3-H9 a fragmentos de Tau 10-44, 10-24, 2-24, 2-34 y Tau de longitud completa. (Fig.12C) Unión de anticuerpo de hlgG1 hu37D3-H9.v5 a fragmentos de Tau 10-44, 10-24, 2-24, 2-34 y Tau de longitud completa.

Figura 13A-13B. Efecto de la función efectora sobre la toxicidad de Tau en cocultivos de neurona-microglía. (Fig.13A) Porcentaje de fragmentación de MAP2 en cocultivos en contacto con diversos anticuerpos y Tau oligomérica. (Fig.13B) Imágenes de neuronas (paneles superiores) y cocultivos de microglía-neuronas (paneles inferiores) en contacto con diversos anticuerpos y Tau oligomérica.

Figura 14. Niveles de pTau212/214 en el hipocampo de ratones a los cuales se les administra IgG2a 37D3-H9 WT antiTau o IgG2 37D3-H9 DANG antitau.

Figura 15. Comparación de secuencias de Tau humana y de mono cynomolgus. Se indica el epítipo para el anticuerpo 37D3-H9.

La figura 16 muestra la farmacocinética del anticuerpo antiTau 94B2-C1 en ratones, después de una única inyección intravenosa o intraperitoneal de 10 mg/kg.

La figura 17 muestra la farmacocinética del anticuerpo antiTau 125B11-H3 en ratones, después de una única inyección intravenosa o intraperitoneal de 10 mg/kg.

La figura 18 muestra un alineamiento de las regiones variables de cadena ligera kappa 1 de hu37D3-H9.v1, hu37D3-H9.v39, hu37D3-H9.v40 y hu37D3-H9.v41.

La figura 19A-18B muestra la concentración del anticuerpo en plasma (Fig.19A) y la concentración de anticuerpo en el LCR (Fig.19B) en monos cynomolgus, luego de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

La figura 20 muestra la concentración de Tau total en plasma y la concentración de anticuerpo en plasma en monos cynomolgus, luego de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

Las figuras 21A-21D muestran la concentración de anticuerpo en diversas regiones de cerebro del mono cynomolgus 2 días y 10 días después de una inyección IV única de hlgG4-S228P hu37D3.v28.A4 (Fig.21A) y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 (Fig.21B) a 50 mg/kg, la concentración promedio de anticuerpo en el cerebro (Fig.21C), el % de concentración de anticuerpo en el cerebro:plasma (Fig.21D).

Las figuras 22A-22B muestran la concentración de anticuerpo en el cerebro de monos cynomolgus en diversos momentos luego de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg, graficada a escala logarítmica (Fig.22A) y lineal (Fig.22B).

Las figuras 23A-23E muestran la concentración de anticuerpo en el hipocampo (Fig.23A), el cerebelo (Fig.23B), la corteza frontal (Fig.23C), el LCR (Fig.23D) y el plasma (Fig.23E) de monos cynomolgus en diversos momentos luego de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

Las figuras 24A-24B muestran la concentración de Tau total promedio (Fig.24A) e individual (Fig.24B) en plasma con el transcurso del tiempo en monos cynomolgus, luego de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

La figura 25A-25B muestra el alineamiento de secuencia entre los anticuerpos hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 y hu37D3-H9.v93 madurados por afinidad con respecto al anticuerpo hu37D3-H9.v28.A4 original. Las diferencias de aminoácidos se marcan con sombra negra.

Las figuras 26A-26B muestran mediciones de afinidad de hu37D3-H9.v76 con respecto al monómero de Tau humana (Fig.26A) y el monómero de Tau de mono cynomolgus (Fig.26B).

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

I. DEFINICIONES

Una «estructura humana aceptora», para los propósitos de la presente, es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable de cadena ligera (VL) o una estructura de dominio variable de cadena pesada (VH) derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o de una estructura consenso humana, según la definición posterior. Una estructura humana aceptora «derivada de» una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de esta o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la cantidad de cambios en los aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, la estructura humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana de VL o secuencia de estructura consenso humana.

«Afinidad» se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej., un anticuerpo) y su compañero de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, en el presente contexto, «afinidad de unión» se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (p. ej., anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con respecto a su compañera Y puede estar generalmente representada por la constante de disociación (K_D). Se puede medir la

afinidad mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos aquellos descritos en la presente. A continuación se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión.

Un anticuerpo «madurado por afinidad» se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés), en comparación con un anticuerpo original sin dichas alteraciones, y dichas alteraciones producen una mejora en la afinidad del anticuerpo con respecto al antígeno.

Los términos «anticuerpo antitau» y «un anticuerpo que se une a tau» se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a Tau con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento hacia tau. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo antiTau a una proteína distinta a Tau no relacionada es inferior a aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a tau, según lo medido, p. ej., mediante un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une a Tau tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En ciertas realizaciones, un anticuerpo antiTau se une a un epítipo de Tau que se conserva entre Tau de diferentes especies. El término «anticuerpo antitau» y «anticuerpo que se une a tau» en el presente contexto, se refiere a un anticuerpo que se une a Tau monomérica, Tau oligomérica y/o Tau fosforilada, a menos que se indique específicamente lo contrario. En algunas de esas realizaciones, el anticuerpo antiTau se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada con afinidades comparables, tal como con afinidades que difieren en no más de 50 veces entre sí. En algunas realizaciones, un anticuerpo que se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada es denominado un «anticuerpo pantau».

El término «anticuerpo» en la presente se utiliza en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen meramente a título enunciativo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando estos demuestren la actividad deseada de unión al antígeno.

Un «fragmento de anticuerpo» se refiere a una molécula que no sea un anticuerpo intacto, que comprenda una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, meramente a título enunciativo, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de una sola cadena (p. ej., scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un «anticuerpo que se une al mismo epítipo» que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. Se proporciona en la presente un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo «quimérico» se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o ligera es derivada de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera es derivado de una fuente o especie diferente.

La «clase» de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante en poder por parte de su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de estos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término «agente citotóxico» en el presente contexto se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, meramente a título enunciativo, isótopos radiactivos (p. ej., At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² y los isótopos radiactivos de Lu), agentes o fármacos quimioterapéuticos (p. ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes), agentes inhibidores del crecimiento, enzimas y fragmentos de estas, tales como las enzimas nucleolíticas, antibióticos, toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos los fragmentos y/o las variantes de estos y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos más adelante.

Las «funciones efectoras» se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían según el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión de receptores de Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), fagocitosis; regulación descendiente de receptores de superficie celular (p. ej., receptor de células B) y activación de células B.

Una «cantidad eficaz» de un agente, p. ej., una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término «región Fc» en la presente se emplea para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene por lo menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En algunas realizaciones, una región Fc de cadena pesada de la IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina de extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante es acorde al sistema de numeración de la UE, también llamado índice UE, según lo descrito por Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de salud pública, Institutos nacionales de la salud, Bethesda, MD, 1991.

«Estructura» o «FR» se refiere a residuos de dominio variable que no sean los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable en general consiste en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR en general aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1–H1(L1)–FR2–H2(L2)–FR3–H3(L3)–FR4.

Los términos «anticuerpo de longitud completa», «anticuerpo intacto» y «anticuerpo entero» se emplean indistintamente en la presente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de un anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc según lo definido en la presente.

Los términos «célula hospedadora», «línea celular hospedadora» y «cultivo de células hospedadoras» se utilizan indistintamente y se refieren a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células hospedadoras incluyen «transformantes» y «células transformadas», las cuales incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de esta, sin tener en cuenta la cantidad de pasajes. La progenie puede no ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La progenie mutante que tenga la misma función o actividad biológica que la preanalizada o seleccionada en la célula originalmente transformada queda incluida en la presente.

Un «anticuerpo humano» es aquel que posee una secuencia de aminoácidos la cual corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprenda residuos de unión al antígeno no humano.

El término «región variable» o «dominio variable» se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural en general tienen estructuras similares, cada uno con cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Ver, por ejemplo, Kindt et ál. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Adicionalmente, pueden aislarse anticuerpos que se unan a un antígeno en particular empleando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se una al antígeno para preanalizar una genoteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Ver, p. ej., Portolano et ál., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et ál., *Nature* 352:624-628 (1991).

Una «estructura consenso humana» es una estructura, la cual representa a los residuos de aminoácidos de presentación más común en una selección de secuencias de estructura VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación de NIH 91–3242, Bethesda MD (1991), tomos 1–3. En algunas realizaciones, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et ál., *supra*. En algunas realizaciones, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et ál., *supra*.

Un anticuerpo «humanizado» se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende los residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y en general dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (p. ej., CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender por lo menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una «forma humanizada» de un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sido objeto de humanización.

El término «región hipervariable» o «HVR» en el presente contexto se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo, las cuales son hipervariables en secuencia («regiones determinantes de complementariedad» o «CDR») y/o forman bucles estructuralmente definidos («bucles hipervariables») y/o contienen los residuos de contacto con el antígeno («contactos de antígeno»). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Los ejemplos de HVR en la presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-

32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que se presentan en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de salud pública, Institutos nacionales de la salud, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígenos que se presentan en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum et ál. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)) y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluidos los residuos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (p. ej., los residuos de FR) están numerados en la presente de acuerdo con Kabat et ál., *supra*.

Un «inmunoconjugado» es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas que incluyen, meramente a título enunciativo, un agente citotóxico.

Un «individuo» o «sujeto» es un mamífero. Los mamíferos incluyen, meramente a título enunciativo, animales domésticos (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej., humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un humano.

Un anticuerpo «aislado» es aquel que ha sido separado de un componente de su medioambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o 99 % de pureza, según lo determinado, a modo de ejemplo, con un método electroforético (p. ej., SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatográfico (p. ej., HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Se puede acceder a un análisis de los métodos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, p. ej., en Flatman et ál., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico «aislado» se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que comúnmente contienen la molécula de ácido nucleico, aunque la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

«Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antitau» se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesada y ligera de anticuerpos (o sus fragmentos), incluidas las moléculas de ácido nucleico en un único vector o vectores separados y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.

El término «anticuerpo monoclonal» en el presente contexto se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, p. ej., que contienen mutaciones de presentación natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales y dichas variantes en general están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de los anticuerpos policlonales, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de conformidad con la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de técnicas, que incluyen meramente a título enunciativo el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana. Dichos métodos y otros métodos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

Un «anticuerpo no conjugado» se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (p. ej., un resto citotóxico) o una radioetiqueta. El anticuerpo no conjugado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

«Anticuerpos naturales» se refiere a moléculas de inmunoglobulina de presentación natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG naturales son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestos por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por disulfuro. Desde el extremo N hasta el extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N hasta el extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada un dominio ligero variable o un dominio variable de cadena ligera, seguida por un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede estar asignada a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término «prospecto» se emplea para hacer referencia a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases

comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

5 «Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos», con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después del alineamiento de las secuencias y de la introducción de huecos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para los
10 propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro del conocimiento de la técnica, por ejemplo, empleando un programa informático disponible para todo público, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para el alineamiento de secuencias, incluido cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de la presente, sin embargo, el % de valores de identidad de secuencias de aminoácidos se genera empleando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático para la comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado con la documentación del usuario en la Oficina de derecho de autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde fue registrado con el número de registro de derecho de autor de Estados Unidos TXU510087. El público general puede obtener el programa ALIGN-2 de Genentech, Inc., sur de San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, incluido UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros para la comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

25 En situaciones en las cuales se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A con respecto a una secuencia de aminoácidos determinada B (lo cual puede describirse alternativamente como una secuencia aminoacídica determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia aminoacídica con respecto a una secuencia aminoacídica determinada B) se calcula de la siguiente manera:

30
$$100 \text{ veces la fracción } \frac{X}{Y}$$

en la que X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B y en la que Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos empleados en la presente se obtienen según lo descrito en el párrafo inmediatamente precedente, empleando el programa informático ALIGN-2.

40 El término «formulación farmacéutica» se refiere a una preparación, la cual está en una forma tal que permita que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se le administraría la formulación.

45 Un «portador farmacéuticamente aceptable» se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, sin ser un ingrediente activo, el cual no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, meramente a título enunciativo, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

50 El término «tau», en el presente contexto, se refiere a cualquier proteína Tau natural de cualquier fuente de vertebrado, incluidos mamíferos, tales como primates (p. ej., humanos) y roedores (p. ej., ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término abarca Tau «de longitud completa», Tau sin procesar, así como también cualquier forma de Tau que sea el resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de presentación natural de tau, p. ej., variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

55 El término «pTau», en el presente contexto, se refiere a Tau en la que un residuo de serina, treonina o tirosina es fosforilado mediante una proteína quinasa mediante la adición de un grupo fosfato unido covalentemente. En algunas realizaciones, la pTau se fosforila en un residuo de serina o en un residuo de treonina. En algunas realizaciones, la pTau se fosforila en la serina en la posición 409 y/o la serina en la posición 404. En algunas realizaciones, la pTau se fosforila en la serina en la posición 409.

60 Los términos «Tau soluble» o «proteína Tau soluble», en el presente contexto, se refieren a proteínas que consisten en monómeros de proteína/péptido Tau completamente solubilizados o en péptidos/proteínas tipo Tau o en péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o en otros derivados de monómeros de péptidos/proteínas Tau y en oligómeros de proteínas tau. «Tau soluble» excluye particularmente los ovillos neurofibrilares (NFT).

65 El término «Tau insoluble», en el presente contexto, se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos o

proteínas Tau o de péptidos/proteínas tipo Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas, las cuales son insolubles tanto *in vitro* en un medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de un mamífero o humano, más particularmente en el cerebro, aunque en especial se refiere a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de derivados de estos, los cuales son insolubles en el cuerpo de un mamífero o humano, más específicamente en el cerebro, respectivamente. «Tau insoluble» incluye en especial los ovillos neurofibrilares (NFT).

Los términos «Tau monomérica» o «monómero de tau», en el presente contexto, se refieren a proteínas Tau completamente solubilizadas sin complejos agregados en medio acuoso.

Los términos «Tau agregada», «Tau oligomérica» y «oligómero de tau», en el presente contexto, se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau o de péptidos/proteínas tipo Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas, las cuales son insolubles o solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de un mamífero o humano, más particularmente, en el cerebro, aunque particularmente a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de derivados de estos, los cuales son insolubles o solubles en el cuerpo de un mamífero o de un humano, más específicamente, en el cerebro, respectivamente.

Los términos «PHF de pTau», «PHF» y «filamentos helicoidales emparejados», se emplean en la presente como sinónimos y se refieren a pares de filamentos enrollados en hélices con una periodicidad de 160 nm, visibles en microscopía electrónica. El ancho varía entre 10 y 22 nm. Los PHF son las estructuras predominantes en los ovillos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (EA) y en los hilos del neurópilo. Los PHF también pueden verse en algunas, pero no en todas, las neuritis distróficas asociadas con las placas neuríticas. El componente principal de los PHF es una forma hiperfosforilada de proteína Tau asociada con microtúbulos. Los PHF pueden estar compuestos parcialmente por proteínas Tau hiperfosforiladas antiparalelas enlazadas con disulfuro. Los PHF Tau pueden estar truncados en sus 20 residuos de aminoácidos de extremo C. Los mecanismos subyacentes a la formación de PHF son inciertos, aunque la hiperfosforilación de Tau puede separarlos de los microtúbulos y aumentar el grupo soluble de Tau a partir del cual pueden formarse PHF dentro de las neuronas.

En el presente contexto, «tratamiento» (y sus variaciones gramaticales, tales como «tratar» o «que trata») se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se está tratando y puede llevarse a cabo ya sea de manera profiláctica o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, meramente a título enunciativo, evitar la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad y lograr la remisión o un mejor pronóstico. En algunas realizaciones, se emplean los anticuerpos de la invención para demorar el desarrollo de una enfermedad o desacelerar el avance de una enfermedad.

El término «enfermedad de Alzheimer temprana» o «EA temprana» en el presente contexto (p. ej., un «paciente con diagnóstico de EA temprana» o un «paciente que padece EA temprana») incluye pacientes con deterioro cognitivo leve, tal como un déficit de memoria, debido a EA, y pacientes que tienen biomarcadores de EA, por ejemplo, pacientes positivos para el amiloide.

El término «enfermedad de Alzheimer leve» o «EA leve» en el presente contexto (p. ej., un «paciente con diagnóstico de EA leve») se refiere a una etapa de la EA caracterizada por un valor de MMSE de 20 a 26.

El término «enfermedad de Alzheimer leve a moderada» o «EA leve a moderada» en el presente contexto abarca tanto la EA leve como moderada y se caracteriza por un valor de MMSE de 18 a 26.

El término «enfermedad de Alzheimer moderada» o «EA moderada» en el presente contexto (p. ej., un «paciente con diagnóstico de EA moderada») se refiere a una etapa de la EA caracterizada por un valor de MMSE de 18 a 19.

El término «MMSE» se refiere a miniexamen del estado mental, el cual brinda una puntuación entre 1 y 30. Ver Folstein, et ál., 1975, J. Psychiatr. Res. 12:189–98. Las puntuaciones de 26 y más bajas son generalmente consideradas una indicación de un déficit. Cuanto más baja es la puntuación numérica en el MMSE, mayor es el déficit o deterioro del paciente analizado con relación a otro individuo con una puntuación más baja. Un aumento en la puntuación del MMSE puede ser una indicación de una mejora en el estado del paciente, mientras que una disminución en la puntuación en el MMSE puede indicar un empeoramiento en el estado del paciente.

El término «vector» en el presente contexto se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está ligado. El término incluye al vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación, así como también al vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales están ligados operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente «vectores de expresión».

II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

Se proporcionan anticuerpos que se unen a tau. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente se une a Tau monomérica humana con una K_D de menos de 1 nM o menos de 0,5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo proporcionado en la presente se une a Tau de mono cynomolgus con una K_D de menos de 1 nM o menos de 0,5 nM. En algunas modalidades, la K_D se determina mediante resonancia de plasmones superficiales a 37 °C. Un anticuerpo de la invención se une a tau, se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada. Un anticuerpo de la invención se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 2 a 24 de Tau humana madura. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítipo de Tau humana que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRK (SEC ID NO: 2). En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítipo de Tau de mono cynomolgus que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRK (SEC ID NO: 4). En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítipo de Tau humana que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRK (SEC ID NO: 2) y un epítipo de Tau de mono cynomolgus que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRK (SEC ID NO: 4).

Los anticuerpos de la invención son útiles, p. ej., para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

A. Anticuerpos antiTau ejemplares

El anticuerpo de la presente invención comprende HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 605, HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 606; HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 607; HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 608, HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 609 y HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 610.

En cualquiera de las realizaciones antes mencionadas, un anticuerpo antiTau es humanizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo antiTau comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones precedentes y comprende además una estructura humana aceptora, p. ej., una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana.

En otra realización, el anticuerpo antiTau comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 603, 614 o 619. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, aunque un anticuerpo antiTau que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a tau. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos en las SEC ID NO: 603, 614 o 619. Las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo antiTau comprende la secuencia de VH en las SEC ID NO: 603, 614 o 619, incluidas las modificaciones postraducción de esa secuencia.

En otra realización, el anticuerpo antiTau comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 604, 615 o 620. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (p. ej., sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con relación a la secuencia de referencia, aunque un anticuerpo antiTau que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a tau. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados y/o suprimidos en las SEC ID NO: 604, 615 o 620. Las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo antiTau comprende la secuencia de VL en las SEC ID NO: 341, 604, 615 o 620, incluidas las modificaciones postraducción de esa secuencia.

En algunas modalidades, un anticuerpo antiTau comprende:

- a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 603,
- b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 604,
- c) una VH como en (a) y una VL como en (b),
- d) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 614,
- e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 615,
- f) una VH como en (d) y una VL como en (e),
- g) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la

SEC ID NO: 619,

h) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 620,

i) una VH como en (g) y una VL como en (h).

5

En algunas modalidades, un anticuerpo antiTau comprende:

a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEC ID NO: 603,

b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEC ID NO: 604,

10 c) una VH como en (a) y una VL como en (b),

d) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 614,

e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 615,

f) una VH como en (d) y una VL como en (e),

15 g) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 619,

h) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 620,

i) una VH como en (g) y una VL como en (h).

En algunas modalidades, un anticuerpo antiTau comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de las SEC ID NO: 603, 614 y 619, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia que se selecciona de las SEC ID NO: 604, 615 y 620.

En algunas modalidades, un anticuerpo antiTau comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 603 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 604, (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 614 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 615 o (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 620.

En algunas modalidades, un anticuerpo antiTau comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613, (b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618 o (c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo antiTau de acuerdo con cualquiera de las realizaciones antes mencionadas es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo antiTau es un fragmento de anticuerpo, p. ej., un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, p. ej., un anticuerpo intacto de IgG1 o IgG4 u otra clase o isotipo de anticuerpo según lo definido en la presente.

En un aspecto adicional, un anticuerpo antiTau de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, en forma individual o en combinación, según lo descrito en las Secciones 1-7 que aparecen posteriormente:

1. Afinidad de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente tiene una constante de disociación (K_D) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (p. ej., 10^{-8} M o menos, p. ej., entre 10^{-8} M y 10^{-13} M , p. ej., entre 10^{-9} M y 10^{-13} M).

En algunas realizaciones, la K_D se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radioetiquetado (RIA). En algunas realizaciones, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de Fab con respecto al antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno etiquetado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no etiquetado y luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo antiFab (ver, p. ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865–881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante toda la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo antiFab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n. ° 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno con [^{125}I] con diluciones seriadas de un Fab de interés (p. ej., de manera coherente con la evaluación del anticuerpo antiVEGF, Fab-12, en Presta et ál., *Cancer Res.* 57:4593–4599 (1997)). Luego se incuba el Fab de interés durante toda la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (p. ej., aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance ese equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (p. ej., durante una hora). Luego, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se agregan 150 μl /pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a 20 % de la unión máxima, para uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la K_D se mide empleando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales

BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo empleando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C o 37 °C con chips de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de resonancia (UR). En algunas realizaciones, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de resonancia (UR) de proteína acoplada. Luego de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de la cinética, se inyectan diluciones seriadas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de surfactante de polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (kon) y las velocidades de disociación (koff) empleando un modelo simple de unión Langmuir uno a uno (software de evaluación BIACORE® versión 3,2) ajustando en forma simultánea los sensogramas de asociación y disociación. Se calcula la constante de disociación en equilibrio (K_D) como la relación koff/kon. Ver, p. ej., Chen et ál., *J. Mol. Biol.* 293:865–881 (1999). Si la velocidad de asociación excede 106 M⁻¹ s⁻¹ según el ensayo de resonancia de plasmones superficiales mencionado anteriormente, entonces se puede determinar la velocidad de asociación empleando una técnica de templado fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm, emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno de 20 nM (forma de Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones en aumento de antígeno, según lo medido en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con flujo de detención (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro serie 8000 SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) con una cubeta agitadora.

2. Fragmentos de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, meramente a título enunciativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv y otros fragmentos descritos posteriormente. Se puede acceder a una descripción de ciertos fragmentos de anticuerpos en Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129–134 (2003). Se puede acceder a una descripción de fragmentos scFv, p. ej., en Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269–315 (1994); véanse además WO 93/16185 y las patentes estadounidenses n.º 5.571.894 y 5.587.458. Se puede acceder a una descripción de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen mayor vida media *in vivo* en la patente estadounidense n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, EP 404.097, WO 1993/01161, Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003) y Hollinger et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 6444–6448 (1993). Se describen también triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et ál., *Nat. Med.* 9:129–134 (2003).

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, p. ej., la patente estadounidense n.º 6.248.516 B1).

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas, que incluyen meramente a título enunciativo digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como también producción mediante células hospedadoras recombinantes (p. ej., *E. coli* o fago), según lo descrito en la presente.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo quimérico. Se describen ciertos anticuerpos quiméricos, p. ej., en la patente estadounidense No. 4.816.567 y en Morrison et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81:6851–6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (p. ej., una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo «con cambio de clase», en el cual se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de unión al antígeno.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. En general, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos, a la vez que conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los cuales las HVR, p. ej., CDR (o porciones de estas) son derivadas de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de estas) son derivadas de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá además por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej., el anticuerpo del cual derivan los residuos de HVR), p. ej., para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para su preparación se describen, p. ej., en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008) y se describen adicionalmente, p. ej., en Riechmann et ál., *Nature* 332:323–329 (1988); Queen et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 86:10029–10033 (1989); las patentes estadounidenses n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri et ál., *Methods* 36:25–34 (2005) (que describen injerto de regiones determinantes de especificidad (SDR, por sus siglas en inglés)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489–498 (1991) (que describe el «revestimiento»); Dall'Acqua et ál., *Methods* 36: 43–60 (2005) (que describen la «transposición de FR») y Osbourn et ál., *Methods* 36: 61–68 (2005) y Klimka et ál., *Br. J. Cancer*, 83: 252–260 (2000) (que describen el enfoque de «selección guiada» para la transposición de FR).

Las regiones de estructura humanas que pueden usarse para la humanización incluyen, meramente a título enunciativo: regiones de estructura seleccionadas utilizando el método de «mejor ajuste» (véase, por ejemplo, Sims et ál., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)), regiones de estructura derivadas de la secuencia de consenso de los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (ver, por ejemplo, Carter et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 89:4285 (1992) y Presta et ál., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)), regiones de estructura maduras humanas (somáticamente mutadas) o regiones de estructura de la línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619–1633 (2008)) y regiones de estructura derivadas de preselección de genotecas de FR (véanse, por ejemplo, Baca et ál., *J. Biol. Chem.* 272: 10678–10684 (1997) y Rosok et ál., *J. Biol. Chem.* 271 :22611–22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368–74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450–459 (2008).

Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas como respuesta a una prueba con antígeno. Dichos animales en general contienen la totalidad o una porción de los loci de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan a los loci de inmunoglobulina endógena o los cuales están presentes extracromosómicamente o están integrados de forma aleatoria en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los loci de inmunoglobulina endógena han sido generalmente inactivados. Se puede acceder a una descripción de los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos en Lonberg, *Nat. Biotech.* 23: 1117–1125 (2005). Véanse además, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™, la patente estadounidense n.º 5.770.429, que describe la tecnología HUMAB®, la patente estadounidense n.º 7.041.870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también pueden prepararse mediante métodos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véanse, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et ál., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51–63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987) y Boerner et ál., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de la tecnología de hibridoma de células B humanas también se describen en Li et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 103:3557–3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos de IgM humana monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265–268 (2006) (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927–937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental y Clinical Pharmacology*, 27(3): 185–191 (2005).

Los anticuerpos humanos también pueden ser generados aislando secuencias de dominio variable de clon de Fv seleccionadas de genotecas de expresión en fagos derivadas de humano. Luego, dichas secuencias de dominio variable pueden combinarse con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de las genotecas de anticuerpos se describen posteriormente.

5. Anticuerpos derivados de genotecas

Los anticuerpos de la invención pueden aislarse mediante preselección de genotecas de combinación para determinar anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen diversos métodos en la técnica para generar genotecas de expresión en fagos y realizar la preselección de dichas genotecas para determinar anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom et ál., *Methods in Molecular Biology* 178: 1–37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et ál., *Nature* 348:552–554; Clackson et ál., *Nature* 352: 624–628 (1991); Marks et ál., *J. Mol. Biol* 222: 581–597 (1992); Marks y Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248: 161–175 (Lo, ed.,

Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et ál.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299–310 (2004); Lee *et ál.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073–1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 101(34): 12467–12472 (2004) y Lee *et ál.*, *J. Immunol. Methods* 284(1–2): 119–132 (2004).

5 En ciertos métodos de expresión en fagos, se clonan por separado repertorios de genes VH y VL mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y se recombinan de forma aleatoria en genotecas de fagos, que luego pueden someterse a preselección para determinar fagos de unión al antígeno, según lo descrito en Winter *et ál.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433–455 (1994). Los fagos típicamente expresan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab. Las genotecas de fuentes inmunizadas
10 proporcionan anticuerpos de gran afinidad con respecto al inmunógeno, sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, se puede clonar el repertorio sin tratamiento previo (por ejemplo, de humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para un amplio rango de antígenos no propios y también antígenos propios sin inmunización alguna, según lo descrito por Griffiths *et ál.*, *EMBO J* 12:725–734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse genotecas sin tratamiento previo sintéticamente, clonando segmentos génicos V no reordenados de células madre y utilizando cebadores de PCR que contengan una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y lograr el reordenamiento *in vitro*, según lo descrito por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381–388 (1992). Las publicaciones de patente que describen genotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5.750.373 y las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y
20 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados de genotecas de anticuerpos humanos son considerados anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente.

25 6. Anticuerpos multispecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multispecífico, *p. ej.*, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multispecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con respecto a por lo menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es con respecto a Tau y la otra es con respecto a cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es con respecto a Tau y la otra es con respecto al beta amiloide. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de tau. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser empleados para localizar agentes citotóxicos de células que expresan tau. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Las técnicas para preparar anticuerpos multispecíficos incluyen, meramente a título enunciativo, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada – cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 y Traunecker *et ál.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y modificación genética de «botón y ojal» (ver, *p. ej.*, la patente estadounidense n.º 5.731.168). Los anticuerpos multispecíficos también pueden ser preparados mediante la realización de efectos de direccionamiento electrostático para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (WO 2009/089004A1), reticulación dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, *p. ej.*, la patente estadounidense n.º 4.676.980 y Brennan *et ál.*, *Science*, 229: 81 (1985)), uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, *p. ej.*, Kostelny *et ál.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547–1553 (1992)), uso de tecnología de «diacuerpos» para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, *p. ej.*, Hollinger *et ál.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:6444–6448 (1993)) y uso de dímeros de Fv de cadena única (sFv, por sus siglas en inglés) (ver, *p. ej.*, Gruber *et ál.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)) y preparación de anticuerpos triespecíficos según lo descrito, *p. ej.*, en Tutt *et ál.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Los anticuerpos contruidos por ingeniería genética con tres o más sitios de unión al antígeno funcionales, incluidos «anticuerpos pulpo» también se incluyen en la presente (ver, *p. ej.*, US 2006/0025576A1).

El anticuerpo o fragmento de la presente también incluye un «Fab de doble acción» o «DAF (por sus siglas en inglés», que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a tau, así como también otro antígeno diferente (ver, US 2008/0069820, por ejemplo).

55 7. Variantes de anticuerpos

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente, en la medida en que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia nucleotídica que codifica al anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea las características deseadas, *p. ej.*, unión al antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y delección

En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos.

- 5 Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado «sustituciones preferidas». Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado «sustituciones ejemplares» y según lo descrito adicionalmente más adelante en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos pueden someterse a preselección para determinar una actividad deseada, p. ej.,
- 10 conservación/mejora de la unión al antígeno, menor inmunogenicidad o mejor ADCC o CDC.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones referidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden ser agrupados de acuerdo con propiedades comunes de cadenas laterales:

- 15 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 20 (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- 25 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 30 Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que pueden ser tomados como objetivo para la mutagénesis se denomina «mutagénesis de barrido de alanina», según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081–1085. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivos (p. ej., residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) son identificados y reemplazados por un aminoácido neutro o con carga negativa (p. ej., alanina o polialanina), para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden
- 35 introducir otras sustituciones en las ubicaciones de los aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Alternativamente o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno – anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos lindantes pueden ser tomados como objetivo o eliminados como candidatos para la sustitución. Pueden someterse a preselección variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

- 40 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como también inserciones de intrasecuencias de residuos de aminoácido único o múltiples aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de

anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima (p. ej., de ADEPT) o un polipéptido, los cual aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

b) Variantes de glicosilación

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente es alterado para aumentar o reducir el grado hasta el cual el anticuerpo se encuentra glicosilado. La adición o delección de sitios de glicosilación en un anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de modo que se crean o eliminan uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a este. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que está generalmente unido mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, p. ej., Wright et ál. *TIBTECH* 15:26–32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, p. ej., manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como también una fucosa unida a un GlcNAc en el «tallo» de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

En algunas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser entre 1 % y 80 %, entre 1 % y 65 %, entre 5 % y 65 % o entre 20 % y 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con relación a la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (p. ej. estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa) según lo medido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, según lo descrito en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración UE de residuos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar situado aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencias en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función mejorada de ADCC. Ver, p. ej., las publicaciones de patentes estadounidenses n.º US 2003/0157108 (Presta, L.), US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos «desfucosilados» o «deficientes en fucosa» incluyen: US 2003/0157108, WO 2000/61739, WO 2001/29246, US 2003/0115614, US 2002/0164328, US 2004/0093621, US 2004/0132140, US 2004/0110704, US 2004/0110282, US 2004/0109865, WO 2003/085119, WO 2003/084570, WO 2005/035586, WO 2005/035778, WO2005/053742, WO2002/031140, Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004), Yamane–Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 deficientes en fucosilación proteica (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); solicitud de patente estadounidense n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L y WO 2004/056312 A1, Adams et ál., especialmente en el ejemplo 11) y líneas de células sin expresión génica, como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO sin expresión génica (ver, p. ej., Yamane–Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et ál., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006) y WO2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, p. ej., en las cuales un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo es biseccionado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener menor fucosilación y/o mejor función de ADCC. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, p. ej., en WO 2003/011878 (Jean–Mairet et ál.), la patente estadounidense n.º 6.602.684 (Umana et ál.) y US 2005/0123546 (Umana et ál.). Se proporcionan además variantes de anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una mejor función de CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, p. ej., en WO 1997/30087 (Patel et ál.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente así generar una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (p. ej. una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpos que posee alguna, pero no todas las funciones efectoras, que la convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la vida media del anticuerpo *in vivo* sea importante, pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR, por sus siglas en inglés) para asegurar que el anticuerpo carezca de unión al FcγR (y, por ende, probablemente carezca de actividad de ADCC), pero que conserve la capacidad de unión al FcRn. Las células primarias para mediar la ADCC, las células citolíticas naturales, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se sintetiza en la tabla

3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457–492 (1991). Los ejemplos no limitativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente estadounidense n.º 5.500.362 (ver, p. ej. Hellstrom, I. et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 83:7059–7063 (1986)) y Hellstrom, I et ál., *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 82:1499–1502 (1985); 5.821.337 (ver Bruggemann, M. et ál., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo para citometría de flujo de ACT1™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMF, por sus siglas en inglés) y células citolíticas naturales (NK, por sus siglas en inglés). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede ser evaluada *in vivo*, p. ej., en un modelo animal como el descrito en Clynes et ál. *Proc. Nat'l Acad. Sci. EUA* 95:652–656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo sea incapaz de unirse a C1q y, por ende, carezca de actividad de CDC. Ver, p. ej., ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et ál., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et ál., *Blood* 101:1045–1052 (2003) y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). También pueden llevarse a cabo determinaciones de unión a FcRn y de eliminación *in vivo* /vida media usando métodos conocidos en la técnica (ver, p. ej., Petkova, S.B. et ál., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

Los anticuerpos con menor función efectora incluyen aquellos con sustitución de uno o más de residuos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el denominado mutante de Fc «DANA» con sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente estadounidense n.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpos con unión mejorada o reducida a FcR. (Ver, p. ej., la patente estadounidense n.º 6.737.056, WO 2004/056312 y Shields et ál., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001)).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región de Fc con una o más sustituciones de aminoácidos, las cuales mejoran la ADCC, p. ej., sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región de Fc (numeración de residuos de UE).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región de Fc que dan como resultado unión a C1q alterada (es decir, mejor o reducida) y/o Citotoxicidad que Depende del Complemento (CDC), p. ej., según lo descrito en la Patente estadounidense n.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

Los anticuerpos con mayores vidas medias y mejor unión al receptor de Fc neonatal (FcRn, por sus siglas en inglés), el cual es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et ál., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et ál., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et ál.). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones, las cuales mejoran la unión de la región de Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434, p. ej., sustitución de residuo de región Fc 434 (patente estadounidense n.º 7.371.826).

Ver también Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988), patente estadounidense n.º 5.648.260, patente estadounidense n.º 5.624.821 y WO 94/29351, con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc.

d) Variantes de anticuerpos modificadas por técnicas de ingeniería genética con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética con cisteína, p. ej., «thioMAb», en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos cisteína. En realizaciones particulares, los residuos sustituidos ocurren en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se ubican en sitios accesibles del anticuerpo y pueden utilizarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de fármaco o restos de fármaco-enlazador, para crear un inmunoconjugado, según lo descrito adicionalmente en la presente. En ciertas realizaciones, uno o más cualesquiera de los siguientes residuos puede ser sustituido con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera, A118 (numeración UE) de la cadena pesada y S400 (numeración UE) de la región de Fc de cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados con cisteína según lo descrito, p. ej., en la patente estadounidense n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en la presente puede ser adicionalmente modificado para contener restos no proteínaceos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivación del anticuerpo incluyen, meramente a título enunciativo, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles incluyen, meramente a título enunciativo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-

1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (p. ej., glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, la cantidad y/o el tipo de polímeros empleados para la derivación pueden determinarse con base en consideraciones que incluyen, meramente a título enunciativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se desea mejorar, ya sea que el derivado del anticuerpo sea utilizado en una terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente mediante la exposición a radiación. En algunas realizaciones, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, meramente a título enunciativo, longitudes de onda que no dañan células comunes, pero que calientan el resto no proteináceo hasta una temperatura a la cual las células próximas al resto no proteináceo del anticuerpo son eliminadas.

B. Composiciones y métodos recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse usando composiciones y métodos recombinantes, p. ej., según lo descrito en la patente estadounidense n.º 4.816.567. En algunas realizaciones, se proporciona el ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antiTau descrito en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprenda el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprenda el VH del anticuerpo (p. ej., las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (p. ej., vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una realización de ese tipo, una célula hospedadora comprende (p. ej., ha sido transformada con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es eucariótica, p. ej. una célula de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) o célula linfocítica (p. ej., célula Y0, NS0, Sp20). En algunas realizaciones, se proporciona un método para preparar un anticuerpo antitau, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, según lo proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o el medio de cultivo de la célula hospedadora).

Para la producción recombinante de un anticuerpo antitau, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, p. ej., según lo descrito con anterioridad en la presente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para posterior clonación y/o expresión en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifiquen las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procarióticas o eucarióticas descritas en la presente. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, p. ej., las patentes estadounidenses n.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Luego de la expresión, el anticuerpo puede ser aislado de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede ser adicionalmente purificado.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos tales como los hongos filamentosos o la levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluidos hongos y cepas de levaduras cuyas rutas de glicosilación han sido «humanizadas», con el resultado de la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Ver Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li et ál., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados son también derivadas de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de planta e insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales, las cuales pueden utilizarse en conjunto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de planta también pueden utilizarse como hospedadores. Ver, p. ej., las patentes estadounidenses n. 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología

PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden utilizarse células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, las líneas de células de mamífero que se adaptan para crecer en suspensión pueden ser útiles. Otros ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 según lo descrito, p. ej., en Graham et ál., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)), células de riñón de hámster bebé (BHK, por sus siglas en inglés), células sertoli de ratón (células TM4 según lo descrito, p. ej., en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humanas (HELA), células de riñón caninas (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A), células de pulmón humanas (W138), células de hígado humanas (Hep G2), tumor mamario de ratón (MMT 060562), células TRI, según lo descrito, p. ej., en Mather et ál., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células DHFR⁻ CHO (Urlaub et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77:4216 (1980)) y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Se puede acceder a una descripción de ciertas líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, p. ej., en Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, tomo 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente pueden identificarse, preseleccionarse o caracterizarse según sus propiedades físicas/químicas y/ o sus actividades biológicas, mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se analiza para determinar su actividad de unión al antígeno, p. ej., mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia Western, etc.

En otro aspecto, pueden emplearse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compita con un anticuerpo descrito en la presente por la unión a tau. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (p. ej., un epítipo lineal o un epítipo conformacional) al que se unen hu37D3-H9, hu37D3-H9.v28.A4, hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 o hu37D3-H9.v93. Los métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítipo al cual se une un anticuerpo se proporcionan en Morris (1996) «Epitope Mapping Protocols», en *Methods in Molecular Biology*, tomo 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, se incuba Tau inmovilizada (tal como Tau monomérica) en una solución que comprende un primer anticuerpo etiquetado que se une a Tau (p. ej., cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, tal como hu37D3-H9.v28.A4) y un segundo anticuerpo no etiquetado que se somete a análisis para determinar su capacidad para competir con el primer anticuerpo por la unión a tau. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba Tau inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo etiquetado, pero no el segundo anticuerpo no etiquetado. Luego de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a tau, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de etiqueta asociada con Tau inmovilizada. Si la cantidad de etiqueta asociada con Tau inmovilizada se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo con relación a la muestra control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión a tau. Ver Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos antiTau (p. ej., pan-tau) de estos que tengan una actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, p. ej., la unión de dichos anticuerpos a formas múltiples de Tau (p. ej., Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada) y la reducción del nivel de proteína Tau (p. ej., Tau total, Tau soluble total, Tau soluble no fosforilada, Tau fosforilada soluble, Tau insoluble total, Tau no fosforilada insoluble, Tau fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contengan Tau hiperfosforilada, en el cerebro, p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo). También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En ciertas realizaciones, se analiza un anticuerpo de la invención para determinar dicha actividad biológica. Por ejemplo, un modelo animal de tauopatía, tal como un ratón transgénico Tau (p. ej., P301L), puede utilizarse para detectar la unión de anticuerpos antiTau a secciones del cerebro y, por ejemplo, a ovillos neurofibrilares en los cerebros de los ratones transgénicos. Adicionalmente, se puede tratar un modelo animal de tauopatía, tal como un ratón transgénico Tau (p. ej., P301L), con anticuerpos antiTau y se pueden utilizar técnicas experimentales conocidas en la técnica para evaluar si dicho tratamiento reduce el nivel de proteína Tau (p. ej., Tau total, Tau soluble total, Tau fosforilada soluble, Tau no fosforilada soluble, Tau insoluble total, Tau fosforilada insoluble, Tau no fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contengan Tau hiperfosforilada) en el cerebro del ratón (p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo).

D. Inmunoconjugados

La invención proporciona además inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo antiTau en la presente, conjugado con uno o más agentes terapéuticos o isótopos radiactivos adicionales.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo según lo descrito en la presente, conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el radioconjugado para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una etiqueta espín para la toma de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también se conoce como toma de imágenes por resonancia magnética, mri, por sus siglas en inglés), tales como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los conjugados de un anticuerpo pueden prepararse empleando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina según lo descrito en Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026. El enlazador puede ser un «enlazador disociable» que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede emplear un enlazador lábil al ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contenga disulfuro (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992), patente estadounidense n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en la presente contemplan de manera expresa, meramente a título enunciativo, los conjugados preparados con reactivos reticulantes que incluyen, meramente a título enunciativo, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), los cuales se encuentran comercialmente disponibles (p. ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

En ciertas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente es útil para detectar la presencia de Tau en una muestra biológica. El término «detectar» en el presente contexto abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido, tal como líquido cefalorraquídeo, una célula o un tejido del cerebro (p. ej. la corteza cerebral o el hipocampo) o sangre. En algunas realizaciones, una muestra biológica es líquido cefalorraquídeo.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para detectar la presencia de Tau en una muestra biológica. En ciertas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo antiTau según lo descrito en la presente, en condiciones que permitan la unión del anticuerpo antiTau a tau, y detectar si se forma un complejo o no entre el anticuerpo antiTau y tau. Dicho método es un método *in vitro*. Adicionalmente, el complejo formado entre el anticuerpo antiTau y Tau en una muestra biológica de ensayo se puede comparar con el complejo formado en una muestra biológica de control (p. ej. una muestra biológica de un sujeto o sujetos sanos). La cantidad del complejo formado entre el anticuerpo antiTau y Tau en una muestra biológica de ensayo también puede ser cuantificada y comparada con la cantidad del complejo formado en una muestra biológica de control (p. ej., una muestra biológica de un sujeto o sujetos sanos) o con la cantidad promedio del complejo que se sabe que se forma en sujetos sanos.

En algunas realizaciones, se emplea un anticuerpo antiTau para seleccionar sujetos aptos para terapia con un anticuerpo antitau, p. ej., con Tau como un biomarcador para la selección de los pacientes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se emplea un anticuerpo antiTau (p. ej., pan-tau) para detectar si el sujeto tiene una enfermedad o un trastorno relacionado con la proteína Tau o si el sujeto corre un riesgo elevado de contraer (o presenta predisposición a contraer) una enfermedad o un trastorno relacionados con la proteína tau.

Los ejemplos de enfermedades o trastornos que pueden ser diagnosticados empleando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades o trastornos asociados con la proteína Tau y enfermedades o trastornos causados por, o asociados a, la formación de ovillos neurofibrilares o hilos del neurópilo. En algunas realizaciones, las enfermedades o los trastornos que pueden ser diagnosticados empleando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades o trastornos asociados con la proteína Tau que se manifiestan en un deterioro o una pérdida de las funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, el criterio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje y/o navegación espacial. En particular, las enfermedades o los trastornos que pueden ser diagnosticados empleando un anticuerpo de la invención

incluyen tauopatías, tales como tauopatías neurodegenerativas. Los ejemplos de enfermedades o trastornos que pueden ser diagnosticados empleando un anticuerpo de la invención incluyen, meramente a título enunciativo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de las neuronas motoras distinta a Guam con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración palido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, parkinsonismo posencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, un trastorno que puede ser diagnosticado empleando un anticuerpo de la invención es la enfermedad de Alzheimer (EA).

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-Tau etiquetados. Las etiquetas incluyen, meramente a título enunciativo, etiquetas o restos que se detectan directamente (tales como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminiscentes y radiactivas), así como también restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, meramente a título enunciativo, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, p. ej., luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadonas, peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas espín, etiquetas de bacteriófago, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-Tau según lo descrito en la presente se preparan mezclando dicho anticuerpo con el grado deseado de pureza con uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables son generalmente no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, meramente a título enunciativo: agua estéril, amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en la presente incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glicoproteínas de hialuronidasa activas neutras y solubles (sHASEGP, por sus siglas en inglés), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP ejemplares y métodos de uso, incluida rHuPH20, se describen en las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizados ejemplares se describen en la patente estadounidense n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen aquellas descritas en la patente estadounidense n.º 6.171.586 y WO2006/044908 y estas últimas formulaciones incluyen un amortiguador de histidina-acetato.

La formulación de la presente también puede contener más de un ingrediente activo, según lo necesario para la indicación en particular que se esté tratando, con preferencia aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, las cuales están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas.

- 5 Las formulaciones que se utilicen para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, p. ej., mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Composiciones y métodos terapéuticos

- 10 Se puede emplear cualquiera de los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo antiTau para utilizar como un medicamento. En realizaciones particulares, se proporciona un anticuerpo antiTau para utilizar en el tratamiento de una tauopatía, tal como una tauopatía neurodegenerativa. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con la proteína Tau que se pueden tratar con anticuerpos antiTau incluyen, meramente a título enunciativo, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt–Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann–Sträussler–Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, lesión cerebral traumática, esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo–demencia de Guam, enfermedad de las neuronas motoras distinta a Guam con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden–Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann–Pick tipo C, degeneración palido–ponto–nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, parkinsonismo posencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, se proporciona en la presente un anticuerpo antiTau para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). En algunas realizaciones, se proporciona en la presente un anticuerpo antiTau para utilizar en el tratamiento de la EA moderada, EA leve a moderada, EA leve o EA prodrómica. Adicionalmente, las enfermedades o los trastornos asociados con la proteína Tau que se pueden tratar con un anticuerpo antiTau incluyen enfermedades o trastornos que se manifiestan en un deterioro o una pérdida de una función cognitiva, tal como el razonamiento, el criterio situacional, la capacidad de memoria, el aprendizaje y/o la navegación espacial.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención se utiliza para tratar a un individuo que tiene una puntuación de MMSE de entre 20 y 30, entre 20 y 26, entre 24 y 30, entre 21 y 26, entre 22 y 26, entre 22 y 28, entre 23 y 26, entre 24 y 26 o entre 25 y 26. En algunas realizaciones, el paciente tiene una puntuación de MMSE entre 22 y 26. En el presente contexto, una puntuación de MMSE entre dos números incluye los números en cada extremo del rango. Por ejemplo, una puntuación de MMSE entre 22 y 26 incluye puntuaciones de MMSE de 22 y 26.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se utilizan para tratar a un individuo que es «positivo para tau», p. ej., un paciente que tiene depósitos de Tau en el cerebro que son típicos de los trastornos asociados con la proteína tau, p. ej., un paciente que tiene un barrido de PET positivo para tau.

También se describe en la presente un anticuerpo antiTau para emplear en la reducción de los niveles de proteína Tau (p. ej., Tau total, Tau soluble total, Tau fosforilada soluble, Tau insoluble total, Tau fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada) en un individuo. Por ejemplo, dicha reducción puede ocurrir en el cerebro (p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo). Por ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para emplear en la reducción de los niveles de Tau fosforilada. En otro ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para emplear en la reducción de los niveles de Tau insoluble (p. ej., Tau fosforilada insoluble). En otro ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para emplear en la reducción de los niveles de Tau hiperfosforilada. En otro ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para emplear en la reducción de los niveles de filamentos helicoidales emparejados (p. ej., filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada) en un tejido cerebral (p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo). En otro ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para utilizar en un método para reducir los niveles de proteína Tau (p. ej., Tau total, Tau soluble total, Tau fosforilada soluble, Tau insoluble total, Tau fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada) en el cerebro (p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo) en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz del anticuerpo antiTau para reducir los niveles de proteína tau. Un «individuo» de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

En otro ejemplo, se describe un anticuerpo antiTau para utilizar en la modulación de los niveles de proteína Tau (p. ej., Tau total, Tau soluble total, Tau fosforilada soluble, Tau insoluble total, Tau fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada), por ejemplo, en el cerebro (p. ej., en la corteza cerebral y/o en el hipocampo) de un individuo.

También se describe en la presente un método para aliviar uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para el alivio de uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tal como cualquiera

de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, la EA). También se describe en la presente un método para reducir la cantidad de síntomas o la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para reducir la cantidad de síntomas o la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tales como cualquiera de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, EA). En un ejemplo particular, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es un deterioro de la cognición. En un ejemplo específico, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es un deterioro en el aprendizaje y/o en la memoria. En un ejemplo específico, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es una pérdida de memoria de largo plazo. En un ejemplo específico, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es la demencia. En un ejemplo, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es confusión, irritabilidad, agresión, cambios de ánimo o un deterioro del lenguaje. En algunos ejemplos, el síntoma de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau es un deterioro o una pérdida de una o más funciones cognitivas, tales como el razonamiento, el criterio situacional, la capacidad de memoria y/o el aprendizaje. Los métodos descritos en la presente comprenden la administración de una cantidad (p. ej., cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo antiTau a un individuo (p. ej., que muestra uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína tau).

También se describe en la presente un método para retener o aumentar la capacidad de la memoria cognitiva o para desacelerar la pérdida de memoria asociada con una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para conservar o aumentar la capacidad de la memoria cognitiva o para desacelerar la pérdida de la memoria asociada con una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tales como cualquiera de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, EA). Los métodos comprenden la administración de una cantidad (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo antiTau a un individuo (p. ej., que muestra uno o más síntomas de pérdida de la memoria o disminución de la capacidad de memoria).

También se describe en la presente un método para reducir la velocidad de avance de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para disminuir la velocidad de avance de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tales como cualquiera de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, la EA). Los métodos comprenden la administración de una cantidad (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo anti-Tau a un individuo (p. ej., que muestra uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína tau).

También se describe en la presente un método para evitar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para evitar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tales como cualquiera de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, EA). Los métodos comprenden la administración de una cantidad (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo antiTau a un individuo (p. ej., en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína tau).

También se describe en la presente un método para retrasar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau o un anticuerpo antiTau o un medicamento que comprende anticuerpo antiTau para retrasar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína Tau (tales como cualquiera de las enfermedades o los trastornos descritos en la presente, por ejemplo, EA). Los métodos comprenden la administración de una cantidad (p. ej., una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo antiTau a un individuo (p. ej., que muestra uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno asociados con la proteína tau).

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente, p. ej., para utilizar en cualquiera de los métodos terapéuticos antes mencionados. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos antiTau proporcionados en la presente y por lo menos un agente terapéutico adicional, p. ej., según lo descrito posteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse ya sea por sí solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser administrado en forma conjunta con por lo menos un agente terapéutico adicional.

Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención puede ser administrada en combinación con otras composiciones que comprenden un agente terapéutico adicional, tal como una sustancia o compuesto biológicamente activos como, por ejemplo, un compuesto conocido empleado en la medicación de tauopatías y/o de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o tipo amiloide, tal como la proteína β amiloide involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir mejoradores de la transmisión de neuronas, fármacos sicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolina esterasa, bloqueadores de los canales del calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepina, síntesis de acetilcolina, mejoradores del almacenamiento o de la liberación, agonistas de receptores pos-sinápticos de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa A o B, antagonistas de receptores de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, antagonistas de receptores serotoninérgicos u otros agentes terapéuticos. En particular, el agente o compuesto biológicamente activo puede comprender por lo menos un compuesto seleccionado de entre compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes metálicos, inhibidores de la reparación del ADN, tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de beta- y gamma-secretasa, proteínas tau, anticuerpos antiTau (incluidos, meramente a título enunciativo, anticuerpos descritos en WO 2012049570, WO2014028777, WO2014165271, WO2014100600, WO2015200806, US8980270 yUS8980271), neurotransmisor, agentes de descomposición de la lámina beta, moléculas antiinflamatorias, «antisicóticos atípicos» tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B 12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofyllina o un derivado de xantina, junto con un péptido de unión de acuerdo con la invención, incluidos anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y sus fragmentos activos y, opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables e instrucciones para el tratamiento de enfermedades.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede ser administrado en combinación con un fármaco neurológico. Dichos fármacos neurológicos incluyen, meramente a título enunciativo, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluidos, meramente a título enunciativo, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otro aglutinante proteico) que se une específicamente a un objetivo seleccionado entre: beta secretasa, presenilina, proteína precursora amiloide o porciones de esta, péptido beta amiloide o los oligómeros o las fibrilas de estos, receptor de muerte 6 (DR6, por sus siglas en inglés), receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés), parkina y huntingtina; un antagonista del receptor NMDA (es decir, memantina), un agente de agotamiento de monoamina (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloides; un agente anticolinérgico antiparkinsonismo (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexilfenidilo, benztropina, biperidén y trihexifenidil); un agente dopaminérgico antiparkinsonismo (es decir, entacapon, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (incluidos, meramente a título enunciativo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos indicados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprólido); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3-aminopropansulfónico; 3APS); un modulador de la actividad del receptor de serotonina (es decir, xaliproden); un interferón y un glucocorticoide o corticosteroide. El término «corticosteroide» incluye, meramente a título enunciativo, fluticasona (incluido propionato de fluticasona (FP, por sus siglas en inglés)), beclometasona, budesonida, ciclesonida, mometasona, flunisolida, betametasona y triamcinolona. «Corticosteroide inhalable» significa un corticosteroide que es adecuado para la administración por inhalación. Los ejemplos de corticosteroides inhalables son fluticasona, dipropionato de beclometasona, budesonida, furoato de mometasona, ciclesonida, flunisolida y acetónido de triamcinolona.

En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más anticuerpos anti-beta amiloide (anti-Abeta) con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente. Los ejemplos no limitativos de dichos anticuerpos anti-Abeta incluyen crenezumab, solanezumab, bapineuzumab, aducanumab y BAN-2401 (Biogen, Eisai Co., Ltd.). En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más inhibidores de la agregación de beta-amiloides con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la agregación de beta-amiloides incluyen ELND-005 (también denominado AZD-103 o scilo-inositol), tramiprosato y PTI-80 (Exebryl-1®, ProteoTech). En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más inhibidores de BACE con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente. Los ejemplos no limitativos de dichos inhibidores de BACE incluyen E-2609 (Biogen, Eisai Co., Ltd.), AZD3293 (también conocido como LY3314814, AstraZeneca, Eli Lilly & Co.), MK-8931 (verubecestat) y JNJ-54861911 (Janssen, Shionogi Pharma). En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más inhibidores de Tau con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente. Los ejemplos no limitativos de dichos inhibidores de Tau incluyen metiltioninio, LMTX (también conocido como leuco-metiltioninio o Trx-0237, TauRx Therapeutics Ltd.), Rember™ (azul de metileno o cloruro de metiltioninio [MTC, por sus siglas en inglés], Trx-0014, tauRx Therapeutics Ltd.), PBT2 (Prana Biotechnology) y PTI-51-CH3 (tauPro™, ProteoTech). En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más anticuerpos antiTau adicionales con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente. Los ejemplos no limitativos de dichos otros anticuerpos antiTau incluyen BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb) y C2N-8E12 (AbbVie, C2N Diagnostics, LLC). En algunas realizaciones, puede administrarse un inhibidor general de plegamiento erróneo, tal como NPT088 (NeuroPhage Pharmaceuticals), con un anticuerpo antiTau proporcionado en la presente.

En algunas realizaciones, la composición de acuerdo con la invención puede comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención, incluidos anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y los fragmentos activos de estos y, opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden «antisicóticos atípicos», tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina, para el tratamiento de síntomas sicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia notoria, descarrilamiento, tangencialidad) y comportamiento bizarro o desorganizado, así como también anhedonia, insensibilidad emocional, apatía y aislamiento social, junto con el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención o los fragmentos activos de estos y, opcionalmente, un portador y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

Otros compuestos que pueden ser adecuadamente empleados en las composiciones además del anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención son aquellos descritos, por ejemplo, en WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17), incluidos objetivos farmacológicos terapéuticos (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanolsulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas de receptores de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR, por sus siglas en inglés) (páginas 63-67), agentes reductores del colesterol (páginas 68-75), inhibidores amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación amiloide (páginas 77-78), quelantes metálicos (páginas 78-79), antisicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

Dichas terapias combinadas mencionadas anteriormente abarcan la administración combinada (en la cual se incluyen dos o más agentes terapéuticos en las mismas formulaciones o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes, en forma simultánea y/o después de la administración del agente o los agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la administración del anticuerpo antiTau y la administración de un agente terapéutico adicional ocurren dentro de aproximadamente un mes o dentro de una, dos o tres semanas o dentro de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días entre sí.

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluida la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, a través de la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, p. ej., mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en la presente diversos programas de dosificación que incluyen, meramente a título enunciativo, administraciones únicas o múltiples en diversos momentos, administración de bolo e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención serían formulados, dosificados y administrados en forma coherente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno en particular que se está tratando, el mamífero en particular que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los profesionales de la medicina. Aunque esto no es necesario, el anticuerpo está opcionalmente formulado con uno o más agentes actualmente empleados para evitar o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes adicionales depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores descritos con anterioridad. Estos son empleados generalmente en las mismas dosis y vías de administración descritas en la presente o aproximadamente entre 1 y 99 % de las dosis descritas en la presente o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/ clínicamente que es apropiada.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza por sí solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se deba tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo es administrado con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, así como del criterio del médico interviniente. El anticuerpo es adecuadamente administrado al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (p. ej., 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados con anterioridad. Para las administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento en general sería continuado hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo oscilaría entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se pueden administrar una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas) al paciente. Dichas dosis pueden ser administradas en forma discontinua, p. ej., cada semana o cada tres semanas (p. ej., de modo tal que el paciente reciba entre aproximadamente dos y aproximadamente veinte o, p. ej., aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguida por una o más dosis inferiores. Sin

embargo, pueden ser de utilidad otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente monitoreado mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se entiende que pueden llevarse a cabo cualquiera de las formulaciones o los métodos terapéuticos antes mencionados empleando un inmunoconjugado de la invención en lugar de, o además de, un anticuerpo antitau.

H. Artículos de fabricación

También se describe en la presente un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos con anterioridad. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El envase sostiene una composición, la cual está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener una boca de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar la afección elegida. Asimismo, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en el que la composición comprende un agente terapéutico citotóxico adicional u otro agente terapéutico. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden utilizarse para tratar una afección en particular. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación antes mencionados puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo antitau.

III. EJEMPLOS

Lo que sigue son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse otras diversas realizaciones, dada la descripción general proporcionada con anterioridad.

Ejemplo 1: Generación de Tau para inmunización

Generación de Tau recombinante monomérica

Se fusionó la construcción de Tau humana recombinante, la isoforma 2N4R (aminoácidos 2-441) a una etiqueta His de extremo N para facilitar la purificación y caracterización. Véase, p. ej., la figura 15. Se clonó la construcción de fusión en el vector pET52b (Novagen) y se expresó en *E. coli*. Se recolectaron y lisaron las células en condiciones desnaturalizantes, empleando cloruro de guanidinio 7M durante toda la noche a 4 °C con agitación. Se granuló el residuo celular a 40000 rpm durante 1 hora. Se aisló la proteína marcada con His recombinante, mediante cromatografía de afinidad con níquel (resina de afinidad Ni Sepharose excel, GE Healthcare Life Sciences), seguido por cromatografía de exclusión por tamaño (resina Superdex 200, GE Healthcare Life Sciences) en condiciones desnaturalizantes. Se eliminó el cloruro de guanidinio dializando la proteína recuperada en MES 20mM, NaCl 50 mM y TCEP 1mM a pH 6,8. Posteriormente se eliminó la etiqueta His empleando TEV proteasa, seguido por purificación final empleando cromatografía de intercambio catiónico (columna Mono S, GE Healthcare Life Sciences) para eliminar la etiqueta His escindida. El amortiguador de purificación contenía Tritón x-114 al 0,1 % (v/v) para eliminar la endotoxina. Se intercambió la proteína purificada en PBS con TCEP 1 mM. Se analizaron la pureza y el estado monomérico mediante SDS-PAGE y SEC-MALLS. Se confirmó la identidad mediante espectrometría de masas. Se determinó la concentración proteica mediante absorción de UV a 280 nm. El producto final estaba libre de endotoxina (<0,5 UE/mg), según lo determinado mediante el ensayo cinético de lisado de amebocitos de Limulus (LAL, por sus siglas en inglés).

Generación de Tau fosforilada

Se generó Tau fosforilada empleando la construcción Tau 2-441 preparada empleando el método descrito anteriormente. Se fosforiló la construcción proteica empleando PKA quinasa 0,5 µM (Life Technologies), la cual fosforila la serina 409, entre otros residuos. Se incubó la mezcla de reacción con ATP 1 mM, MgCl₂ 5 mM, a temperatura ambiente durante 72 horas. Se confirmó la fosforilación mediante espectrometría de masas. Se empleó cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75, GE Healthcare Life Sciences) para eliminar la quinasa. Se analizaron la pureza, el estado monomérico y el nivel de endotoxina de la preparación de proteína fosforilada sustancialmente según lo descrito con anterioridad.

Oligomerización in vitro de Tau monomérica

Se generó Tau oligomérica empleando la construcción Tau 2-441 monomérica. En primer lugar, se intercambió la proteína monomérica en ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES) 20 mM, NaCl 25 mM, pH 7,4, seguido por oligomerización empleando ácido araquidónico 75 μ M (Cayman Chemicals) y 18 kDa de heparina (Sigma Aldrich), en concentración equimolar con proteína a 37 °C durante 3 días. Se confirmó la oligomerización mediante ensayo de fluorescencia con tioflavina T, dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) y cromatografía de exclusión por tamaño analítica. Tau oligomérica es en algunos casos denominada «oligoTau».

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos antiTau

Métodos

Generación de hibridomas

Se recibieron ratones del tipo salvaje hembras C57BL/6J0laHsd (C57BL/6) y BALB/c OlaHsd (Balb/c) (Harlan, EUA) con 9 semanas de edad. Se recibieron ratones con inactivación de Tau (B6.129-Maptm1Hnd/J; The Jackson Laboratory, EUA) con 6 y 9 semanas de edad. Las vacunaciones comenzaron a las 12 hasta 15 semanas de edad. Los ratones fueron vacunados con Tau humana oligomerizada. Antes de la vacunación, se mezcló la oligoTau con uno de dos adyuvantes empleados en este estudio, sistema adyuvante Ribi (Ribi; Sigma-Aldrich, Suiza) al 50 % v/v o una combinación de oligodesoxinucleótidos de ADN sintético de una sola hebra CpG (CpG; Microsynth, Suiza) e hidróxido de aluminio (Al; Brenntag, Suiza). Ribi es emulsión aceite en agua de escualeno al 2 %, que contiene lípido A de monofosforilo (aislado de *Salmonella minnesota*) y trehalosa dicorinomicolato sintética (aislada del factor de acordonamiento de *Tubercle bacillus*) en aceite de escualeno, Tween-80 al 0,2 % y agua.

Los ratones fueron vacunados mediante inyección subcutánea (s.c.), excepto los grupos D y G, los cuales recibieron una combinación de administraciones intraperitoneales (i.p.) y administraciones en el corvejón. Los ratones en el grupo D recibieron administración de 50 μ g de oligoTau i.p. y 10 μ g de oligoTau como inyección en el corvejón. Los ratones del grupo G recibieron administración de 8 μ g de oligoTau i.p. y 2 μ g de oligoTau como inyección en el corvejón. Véase la tabla 2.

Para las vacunaciones que contenían CpG y Al (CpG/Al) como adyuvante, cada inyección de 200 μ L contenía 60 μ g (30 nmol) de CpG, 1 mg de Al y 50 μ g de oligoTau. Para todos los grupos del estudio, los ratones recibieron las inyecciones los días 0, 14, 35 y 56. Los ratones empleados para la fusión de mieloma (Nanotools, Alemania) fueron adicionalmente vacunados con tres inyecciones diarias de refuerzo de oligoTau (50 μ g por cada inyección i.p.) sin agregado de adyuvante.

Tabla 2. Ratones y protocolos de vacunación

Grupo de estudio	Cepa de Ratón	Dosis de oligoTau total (μ g/inyección)	Adyuvante	Vía de vacunación
A	C57BL/6	50	CpG/Al	s.c.
B	C57BL/6	50	Ribi	s.c.
C	Balb/c	50	CpG/Al	s.c.

(continuación)

Grupo de estudio	Cepa de Ratón	Dosis de oligoTau total (µg/inyección)	Adyuvante	Vía de vacunación
D	Balb/c	60	CpG/Al	corvejón+i.p.
E	Balb/c	5	CpG/Al	s.c.
F	Balb/c	50	Ribi	s.c.
G	Inactivación de Tau	10	Ribi	corvejón +i.p.

Los ratones fueron sangrados y sacrificados un día después de la última de tres inyecciones de refuerzo y se fusionaron los esplenocitos con células de mieloma para generar hibridomas productores de anticuerpos.

5

Selección de hibridomas para subclonación

Para las fusiones, los ratones fueron divididos en tres grupos, para un total de 10 fusiones (2 fusiones en un grupo, cuatro fusiones en el segundo grupo y cuatro fusiones en el tercer grupo), lo cual generó 299 hibridomas. Se cultivaron los hibridomas viables empleando medio de selección que contenía suero y luego se seleccionaron los mejores hibridomas para la subclonación, empleando ensayos ELISA para la unión a Tau humana de longitud completa y oligoTau según lo descrito posteriormente. Después de dilución de limitación, se cultivaron los hibridomas finales en medio libre de suero y se recolectó medio de las colonias estables para preselección y selección de anticuerpos.

10

Ensayos de preselección ELISA

Se recolectaron los sobrenadantes libres de suero de hibridomas estables. Luego se seleccionaron los sobrenadantes que contenían anticuerpos de interés mediante ensayos ELISA para caracterizar propiedades de anticuerpos y seleccionar anticuerpos para posterior desarrollo. Se emplearon ensayos ELISA para determinar lo siguiente: unión a Tau humana de longitud completa (flttau; SignalChem, Canadá), unión a flTau hiperfosforilada (Genentech, EUA), unión a preparaciones oligoméricas en comparación con monoméricas de flTau y unión a ciertos epítomos de Tau de anticuerpo. Brevemente, se recubrieron placas de ELISA de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) con uno de los objetivos como se muestra en la Tabla 3.

20

25

Tabla 3. Objetivos empleados para los ensayos de preselección ELISA

Ensayo	Configuración de ELISA	Objetivo
Unión a fltau	ELISA directo	Tau humana de longitud completa (flttau) recubierta a 1 µg/mL
Unión a pTau	ELISA directo	Tau humana de longitud completa fosforilada <i>in vitro</i> empleando 4 quinasas (GSK3β, Cdk5, PKA y CK1δ; Tau hiperfosforilada o pTau) purificadas y recubiertas a 1 µg/mL
Mapeo de epítomos	ELISA directo	Péptidos 15-mero biotinilados que abarcan los 441 aminoácidos (aa) de Tau humana con 9 aa desfasados y 6 aa superpuestos recubiertos a 10 µg/mL sobre una placa de 96 pocillos con estreptavidina
Unión a oligoTau	ELISA de captura	flTau oligomérica y monomérica biotinilada con etiqueta AVI capturada en solución mediante anticuerpos inmovilizados antiIgG en análisis

Se realizó el recubrimiento durante toda la noche en solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) a 4 °C. Se lavaron las placas completamente con Tween-20 al 0,05 % /PBS y luego se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % en Tween-20 al 0,05 %/PBS durante 1 h a 37 °C. Luego se agregó el anticuerpo contenido en el sobrenadante de los hibridomas en las diluciones indicadas y se incubó durante 2 h a 37 °C, después de lo cual se lavaron las placas según lo descrito anteriormente.

30

Para los ELISA directos, se agregó un anticuerpo secundario de IgG antiraton conjugado con AP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Reino Unido) a una dilución 1/6000 en Tween-20 al 0,05 %/PBS durante 2 h a 37 °C. Después del lavado final, se incubaron las placas con solución de sustrato de fosfatasa p-nitrofenilfosfato disódico hexahidrato (pNPP; Sigma-Aldrich, Suiza) y se leyó a 405 nm empleando un lector de placas de ELISA (Tecan, Suiza). Los resultados son expresados como densidades ópticas (D.O.).

35

Para los ELISA de captura de oligoTau y monotau, se inmovilizaron anticuerpos contenidos en sobrenadantes de hibridomas estériles libres de suero sobre una placa recubierta con antiIgG a una dilución de 500 veces, seguido por la incubación de oligoTau o monotau, ambos con biotinilación específica del sitio mediante una etiqueta AVI. Las incubaciones objetivo comenzaron a 5 µg/mL y luego se diluyeron 8 o 16 veces. Se empleó sustrato de estreptavidina-HRP y ABTS para la cuantificación de señales en un lector de placas (Tecan, Suiza). Los resultados son expresados como D.O.

40

Estimaciones de Afinidad

Se estimó la afinidad de los anticuerpos no purificados en sobrenadantes de hibridomas libres de suero mediante resonancia de plasmones de superficie, empleando un instrumento Biacore T-100 (GE Healthcare, Reino Unido). Se inmovilizaron los anticuerpos sobre un chip biosensor antiIgG y se empleó flTau (SignalChem, Canadá) como el analito objetivo. Se realizó un análisis cinético empleando un modelo de ajuste de Langmuir 1:1.

Ensayos SDS-PAGE y transferencia Western

Se analizó la unión de anticuerpos panTau seleccionados a Tau en el cerebro humano en una transferencia Western (WB, por sus siglas en inglés), empleando lisados cerebrales de tres donantes con EA y dos donantes de control sin EA con las mismas edades (Tissue Solutions, Reino Unido). Se procesaron los lisados para obtener una fracción de Tau soluble libre de detergente. Se cargaron los lisados procesados sobre geles bis-tris al 4–12 % (Novex, Life Technologies, Suiza) y se transfirieron a membranas Immobilon PVDF y se sometieron a transferencia con los anticuerpos con los que se estaban analizando y un anticuerpo secundario antirrátón de cabra IRDye 800CW (Li-Cor, EUA).

Ensayo ELISA empleando lisados de cerebro humano

Para evaluar la unión de los anticuerpos seleccionados a Tau humana no desnaturalizada en lisados de cerebro con EA y de control, se inmovilizaron los anticuerpos de sobrenadantes de hibridoma o control negativo y positivo, sobre una placa de 96 pocillos según lo descrito anteriormente. Luego se capturó Tau en lisados de cerebro humano solubles de sujetos de control o con EA de las mismas edades (400 µg/mL de proteína, todos de Tissue Solutions, Reino Unido) y se realizó la detección empleando un anticuerpo de panTau de conejo policlonal (AbCam, Reino Unido), seguido por un IgG-AP anticonejo específico de fragmento de Fc-γ (Jackson ImmunoResearch, EUA). Se empleó lisado cerebral de ratón con inactivación de Tau como un control negativo de muestra. Se incubaron las placas con solución de sustrato de fosfatasa pNPP (Sigma-Aldrich) y se leyeron a 405 nm empleando un lector de placas de ELISA (Tecan, Suiza). Los resultados son expresados como densidades ópticas (D.O.).

Secuenciamiento de hibridomas de anticuerpos

Se suministraron lisados de células de hibridomas a Antitope (Antitope, Reino Unido) para el secuenciamiento de genes de regiones variables. Brevemente, se llevó a cabo RT-PCR empleando grupos de cebadores degenerativos para secuencias señal murinas, junto con cebadores de región constante para cada una de cadenas pesada variable de IgG (VH), VH de IgM, ligera variable kappa de Ig (KVL) y λ VL de Ig. Se amplificó ARNm de región V de cadena pesada empleando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerativos (HA a HF) específicos para secuencias señal de VH, junto con cebadores de región constante específicos de IgM o de IgG. Se amplificó el ARNm de región V de cadena ligera empleando un conjunto de ocho grupos de cebadores degenerativos específicos de secuencias señal, siete para el agrupamiento κ (KA a KG) y uno para el agrupamiento λ (LA), junto con cebadores de región constante κ o λ. Se purificaron los productos de la PCR obtenidos de la amplificación exitosa, se clonaron en un vector de clonación «TA» (pGEM-T Easy, Promega), se transformaron en E.coli y las colonias individuales se secuenciaron. Se determinaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones de VH y VL de los anticuerpos con las secuencias para 27 hibridomas de anticuerpos.

*Resultados**Selección de hibridomas para subclonación*

Los hibridomas que fueron generados a partir de cada una de las tres rondas de fusiones, un total de 299 hibridomas derivados de diez fusiones, se sometieron a ensayos inicialmente para determinar la unión a flTau, con los hibridomas seleccionados sometidos adicionalmente a ensayos para determinar la unión a pTau y a Tau oligomerizada. El objetivo consistió en seleccionar anticuerpos con unión igualmente buena a Tau y a Tau modificada postraducción, tal como Tau fosforilada u oligomérica. Para esto, se llevaron a cabo ensayos en hibridomas para seleccionar las mejores propiedades de pantau. Para determinar la región de unión al anticuerpo y el epítipo de Tau específico, se determinó en primer lugar la región de unión empleando fragmentos diferentes de Tau y luego una genoteca de péptidos de Tau superpuestos 15-meros que abarcan la secuencia completa de 441 aminoácidos (aa) de la isoforma más larga de Tau humana. Se evitó en forma intencional un grupo de anticuerpos que se unen a regiones predeterminadas de Tau con el objetivo de aumentar al máximo la unión a diferentes formas modificadas postraducción de Tau y a la totalidad de las seis isoformas de Tau humana diferentes presentes en los seres humanos.

Las tres series de fusión dieron como resultado la generación de 133 hibridomas estables subclonados que fueron preseleccionados para determinar las mejores propiedades de pantau. Se empleó una combinación de ensayos diferentes de preselección para reducir la cantidad de hibridomas de anticuerpos que tienen las propiedades preferidas para un anticuerpo de pantau. Para comparar la unión de flTau y pTau, se analizaron 90 hibridomas con los resultados de 24 hibridomas mostrados en la figura 1A-1F. Como se había llevado a cabo una preselección inicial empleando

fragmentos de Tau para evitar seleccionar anticuerpos que se unan a regiones de Tau que se sabe que tienen densidad elevada de residuos que se fosforilan en la enfermedad de Alzheimer (EA) y en otras tauopatías, la mayoría de los anticuerpos analizados se unieron tanto a flTau como a pTau con propiedades de unión similares, según lo determinado mediante este ELISA.

5 En algunas realizaciones, es deseable que un anticuerpo de panTau se una tanto a las formas monoméricas como oligoméricas de Tau sin una fuerte preferencia hacia una o la otra. Se configuró un ELISA de captura para determinar si los anticuerpos se unían tanto a las formas monoméricas como a las formas oligoméricas de fltau. Un ELISA
10 realizado en modo de captura conserva la conformación oligomérica de Tau preoligomerizada y el estado monomérico de monoTau mejor que cuando se realiza como un ELISA directo con los objetivos inmovilizados sobre una placa de ELISA.

Cada ensayo se realizó comparando directamente la unión de las dos formas de Tau a los 90 anticuerpos analizados. Se emplearon los anticuerpos que se sabía que tenían unión preferida a oligoTau o que no discriminaban entre las
15 dos formas de Tau como controles en cada ensayo. Los resultados de 18 hibridomas se muestran en la figura 2A-2E.

El mapeo de los epítomos es importante para seleccionar anticuerpos con buenas propiedades de pantau, ya que pueden evitarse los anticuerpos que se unan a regiones con densidad elevada de potenciales residuos de pTau (Ser, Thr y Tyr). También se utilizó la unión a las seis isoformas de Tau humana como un criterio de selección para un
20 anticuerpo de pantau. Los epítomos de panTau de anticuerpos que habían sido inicialmente seleccionados fueron verificados y determinados con mayor exactitud empleando una genoteca de 49 péptidos, cada uno con 15 aminoácidos (aa) que abarcaban la longitud completa de Tau humana, con una superposición de 6 residuos de aa y un desfase de 9 aa. Los números de residuos se basan en la isoforma más larga de Tau humana (441 aa). Se emplearon los anticuerpos no purificados a una dilución 1/10 elevada para verificar la unión con respecto a la no unión
25 a todos los péptidos. La preselección de los anticuerpos de 112 hibridomas previamente seleccionados mediante ELISA indicó la unión a 20 epítomos diferentes de Tau (tabla 4).

Tabla 4: Epítomos de Tau para anticuerpos

Anticuerpo	Epítomo de Tau (aa)
14F5-D9	1-15
94B2-B12	1-15
94B2-C1	1-15
10A1-A6	10-24
10A1-D8	10-24
11E10-B8	10-24
17G12-C11	10-24
17G 12-D5	10-24
19H6-A1	10-24
19H6-F7	10-24
19H6-G8	10-24
37D3-H12	10-24
37D3-H9	10-24
37E8-B4	10-24
37E8-C2	10-24
3A4-H4	10-24
3H10-E12(A)	10-24
3H10-G12	10-24
44B7-A9	10-24
44B7-B1	10-24
54C1-H11	10-24
61E7-B11	10-24
61H10-B4	10-24
61H10-H3	10-24
127G7-A5	10-24
127G7-E7	10-24
115A4-A3	10-24
115A4-B1	10-24

ES 3 021 263 T3

(continuación)

Anticuerpo	Epítipo de Tau (aa)
125B11-B6	10-24
73C8-A5	10-24
73C8-G4	10-24
76B4-D9	10-24
76B4-H7	10-24
30A1-C9	73-87
30A1-D11	73-87
28F5-G8	82-96
28F5-H8	82-96
33G9-A11	100-114
33G9-B9	100-114
52F2-E12	100-114
52F2-E8	100-114
52F6-B3	100-114
52F6-F11	100-114
56D3-C8	100-114
56D3-E9	100-114
70B10-B6B2	100-114
70B10-B6G12	100-114
78E4-D11	100-114
78E4-G4	100-114
30G1-B2	109-123
30G1-C11	109-123
49G10-F4	109-123
49G10-H1	109-123
65B1-A2	109-123
65B1-A7	109-123
73H6-B8	109-123
113F5-A8	109-123
113F5-F7	109-123
125B11-H3	109-123
26C1-B11	118-132
26C1-C8	118-132
74H10-A3	118-132
74H10-C3	118-132
78F3-B2	118-132
78F3-E7C6	118-132
78F3-E7H7	118-132
123E9-B3	19-33
15C6-A7	19-33
19F8-B1	19-33
24A11-D5	19-33
63H3-B2	19-33
63H3-D8	19-33
64B9-E11	19-33
64B9-F12	19-33
45D2-C9	19-33
45D2-F4	19-33
72E12-B2	19-33
72G10-A7	19-33
72G10-B6	19-33
123E9-A1	19-42
19F8-C11	19-42
7A11-C12	19-42
89F4-A2	28-42
89F4-A1	28-44
12A10-E8	37-51
55E7-B12	37-51
72E12-H9	37-51
55E7-F11	37-51
30D12-B5	64-78

(continuación)

Anticuerpo	Epítipo de Tau (aa)
21C1-D8	64-78
21C1-G6	64-78
30D12-F6	64-78
31A3-A4	64-78
31A3-A7	64-78
77D1-D2	64-78
77D1-E6	64-78
126H12-G6	136-150
126H12-H7	136-150
22G7-C9	154-168
22G7-G9	154-168
111B8-C4	163-177
111B8-F10	163-177
66F5-A1	172-177
66F5-F2	172-177
71H8-A1	190-204
71H8-D6	190-204
83E10-D10	190-204
83E10-D6	190-204
126F11-B3	217-231
126F11-G11	217-231
93A8-C9	397-411
93A8-D2	397-411

- 5 Para las mediciones de afinidad a fltau, se midieron 46 anticuerpos empleando SPR en un instrumento Biacore, con determinación de las K_D . Se realizaron mediciones de afinidad Biacore inmovilizando anticuerpos en un chip antiIgG y utilizando flTau como el analito objetivo. Los resultados para 32 anticuerpos se muestran en la tabla 5, con los anticuerpos clasificados con base en la afinidad con respecto a fltau. De los anticuerpos medidos para determinar la afinidad con respecto a fltau, 22 anticuerpos tenían afinidades superiores a 20 nM, de los cuales 14 anticuerpos tenían K_D debajo de 5 nM y el anticuerpo 37D3-H9 tenía una K_D (afinidad) de 1 nM.

Tabla 5: Afinidad con respecto a fltau

Anticuerpo	K_D (nM)
37D3-H9	1
54C1-H11	1,5
3A4-H4	7,8
52F6-F11	8,4
123E9-A1	1,8
94B2-C1	1,9
24A11-D5	2
113F5-F7	2,4
89F4-A1	2,9
19F8-B1	2,9
61E7-C4	3,3
126F11-G11	4,2
26C1-C8	4,3
93A8-D2	4,3
37E8-B4	4,4
61E7-B11	4,8
125B11-H3	6
54C1-C3	6,8
3A4-A12	10,1
44B7-B1	14,7
3H10-E12	19,4
10A1-D8	19,6
52F2-E8	26
19H6-F7	39
34H4-F5	43
19H6-A1	56

(continuación)

Anticuerpo	K _D (nM)
34H4-B10	69
17G12-C11	118
45H12-C4	139
17G12-D5	161
61H10-H3	177
11E10-C3	399

Para verificar la unión de los anticuerpos seleccionados a las seis isoformas de Tau humana, se llevó a cabo un SDS-PAGE con una escalera de Tau recombinante que contenía las seis isoformas y se realizó una transferencia Western (WB) empleando tres anticuerpos antiTau seleccionados. Los tres anticuerpos panTau se unen a las seis isoformas de Tau (figura 3). Adicionalmente, se procesaron en forma simultánea homogenados cerebrales de tres controles de EA y dos controles de las mismas edades con fines comparativos. Según lo esperado y con base en los epítomos mapeados, los tres anticuerpos analizados en este ensayo mostraron unión a las seis isoformas de tau. La diferencia observada en los patrones de bandas entre donantes con EA humanos y de control puede representar la fosforilación y/o agregados de Tau estables en SDS mayor de lo que se esperaba que estaría presente en sujetos con EA.

Se procesaron adicionalmente muestras control y de enfermedad de Alzheimer (EA) humanas en un ensayo de captura ELISA no desnaturalizante, para verificar la unión a Tau en cerebros humanos. Se procesaron lisados de muestra procesados para determinar la Tau soluble de dos sujetos con EA y dos sujetos de control sin EA de las mismas edades a 8 diluciones, con análisis de tres anticuerpos (figura 4A-4C).

Se determinaron las secuencias de cadena variable de anticuerpos para 27 hibridomas (Antitope, Reino Unido). Las secuencias proteicas para ciertos dominios variables de cadena pesada y ligera y regiones hipervariables (HVR) se muestran en la tabla de secuencias.

Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos antitau

Se construyeron cadenas pesada y ligera de anticuerpos por medio de la síntesis génica y subclonación del ADN resultante en vectores de expresión en mamífero de IgG2a murina (cadena pesada) y kappa murina (cadena ligera). Se expresaron los anticuerpos en células CHO o 293T mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de cadena pesada y cadena ligera y se purificaron con resina de afinidad MabSelectSure (GE Healthcare Life Sciences). Se preseleccionaron anticuerpos recombinantes purificados para determinar la unión a proteína monomérica Tau en un instrumento de resonancia de plasmones superficiales Biacore T200, utilizando un kit de captura de IgG de ratón y un chip CM5 serie S. Se capturaron anticuerpos en formato mIgG2a diluidos en HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) durante 30 o 45 segundos a una concentración de 1 µg/ml (anticuerpos 26C1, 94B2-C1, 52F6-F11.v1, 52F6-F11.v2, 11E10-B8, 55E7-F11, 125B11-H3, 123E9-A1, 30G1-B2, 66F5-A1, 89F4-A1, 93A8-D2 y 126F11-G11) o durante 70 o 150 segundos a una concentración de 0,1 µg/ml (anticuerpos 19H6-F7, 3A4-H4, 54C1-H11 y 37D3-H9), utilizando una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se monitoreó la unión de monómero de Tau en HBSP a 25 °C, empleando una velocidad de flujo de 30 µl/min y concentraciones de 16, 31, 63, 125, 250 y 500 nM para los anticuerpos 26C1 y 94B2; 16, 31, 63, 125, 250, 500 y 1000 nM para los anticuerpos 52F6-F11.v1 y 52F6-F11.v2; 6, 19, 56, 167 y 500 nM para los anticuerpos 11E10-B8, 55E7-F11 y 125B11-H3; 5, 16, 49, 148, 444, 1333 y 4000 nM para los anticuerpos 123E9-A1, 30G1-B2, 66F5-A1, 89F4-A1, 93A8-D2 y 126F11-G11; 0,4, 1,6, 6,3, 2,5, 100 y 400 nM para 19H6-F7; y 0,2, 0,8, 4, 4, 20 y 100 nM para 3A4-H4, 54C1-H11 y 37D3-H9. Se monitorearon los tiempos de asociación y disociación durante 180-480 segundos y durante 300-600 segundos, respectivamente. Se seleccionó el anticuerpo 37D3-H9 para posterior análisis debido a la elevada afinidad (tabla 6) y la ausencia de motivos de glicosilación NXS/T en las CDR.

Tabla 6: K_D (nM) de anticuerpos murinos con respecto al monómero de Tau humana. Los datos mostrados representan el producto de un modelo de unión 1:1

Anticuerpo	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
26C1	17	4 × 10 ⁴	4 7 × 10 ⁻⁴
94B2-C1	6	5 × 10 ⁴	4 3 × 10 ⁻⁴
54C1-H11	0,6	3 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻⁴
3A4-H4	12	3 × 10 ⁴	4 3 × 10 ⁻⁴
37D3-H9	1,6	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁻⁴
19H6-F7	10	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻³
11E10-B8	108	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻²
55E7-F11	171	2 × 10 ⁵	4 × 10 ⁻²
125B11-H3	5	5 × 10 ⁴	3 × 10 ⁻⁴
123E9-A1	52	4 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻²

(continuación)

Anticuerpo	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
30G1-B2	20	4 × 10 ⁵	8 × 10 ⁻³
66F5-A1	105	8 × 10 ⁴	8 × 10 ⁻³
89F4-A1	27	3 × 10 ⁵	7 × 10 ⁻³
93A8-D2	6	3 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻³
126F11-G11	3	2 × 10 ⁶	4 × 10 ⁻³
52F6-F11.v1	15	5 × 10 ⁴	7 × 10 ⁻⁴
52F6-F11.v2	5	4 7 × 10 ⁴	4 × 10 ⁻⁴

37D3–H9 demuestra avidez cuando se une a proteína tau

- 5 La proteína Tau monomérica humana se acopló covalentemente a un chip CM5 serie S Biacore empleando el kit de acoplamiento de amina de Biacore (GE Life Sciences), lo que dio como resultado la inmovilización hasta un nivel de aproximadamente 128 UR. Se monitoreó la unión directa de 37D3-H9 en ambos formatos Fab e IgG empleando el formato experimental de cinética de un solo ciclo con cinco períodos de asociación de 300 s cada uno y concentraciones de anticuerpo de 1, 2, 4, 8 y 16 nM (IgG) o 5, 10, 20, 40 y 80 nM (Fab). Se monitoreó la disociación durante 7200 segundos (Fab) o durante 14400 segundos (IgG). Se calculó un valor de la velocidad de disociación ajustando un modelo de unión 1:1 a la información. Las velocidades calculadas de disociación fueron 5,0 × 10⁻⁴ para el Fab 37D3–H9 y 1,1 × 10⁻⁵ para la IgG 37D3–H9, una diferencia de 45 veces. La figura 5 ilustra la diferencia en las velocidades de disociación de Fab (panel izquierdo) e IgG (panel derecho), lo cual indica que la IgG 37D3–H9 está demostrando avidez.

15 Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos antiTau

Se humanizó el anticuerpo 37D3-H9 mediante injerto de las CDR del anticuerpo y residuos de estructura de región variable seleccionados en estructuras consenso de anticuerpo humano (Dennis, M.S. (2010). CDR repair: A novel approach to antibody humanization. En Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing, S.J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold–Peters y J. Andya, eds. (Springer, Nueva York), pp. 9-28). Se evaluó el injerto sobre estructuras VH3, Vk2 y Vk1 consenso. El injerto de cadena pesada incluyó residuo murino en la posición 49 (sistema de numeración de Kabat). El injerto de Vk2 incluyó residuos murinos en las posiciones estructurales 2 y 4. El injerto de Vk1 incluyó residuos murinos en las posiciones estructurales 2, 4 y 43. Se construyeron variantes humanizadas mediante síntesis génica y subclonación en vectores de expresión mamíferos de cadena Kappa e IgG1 o IgG4 humana. Se expresaron los anticuerpos mediante cotransfección de los plásmidos de cadena pesada y ligera en células CHO y se purificaron con resina de afinidad MabSelect Sure. Se preseleccionaron variantes humanizadas para determinar la afinidad con respecto al monómero de Tau humana empleando el kit de captura de IgG humana Biacore, un chip CM5 serie S y un instrumento Biacore T200. Se diluyeron los anticuerpos hasta 2 µg/ml y se capturaron durante 15 segundos a 10 µl/min. Se monitoreó la asociación y disociación de 100, 33, 11 y 3,7 nM de monómero de Tau humana en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) durante 180 segundos y 600 segundos, respectivamente, a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se aplicó un modelo de unión 1:1 a los resultados (tabla 7).

35 Tabla 7: Preselección de afinidad de variantes humanizadas con respecto a Tau humana monomérica

Variante de anticuerpo	Estructura de cadena ligera	K _D (nM)
hu37D3–H9.v1	Kappa1	4,1
hu37D3–H9.v2	Kappa1	5,6
hu37D3–H9.v3	Kappa1	8,8
hu37D3–H9.v4	Kappa1	8,2
hu37D3–H9.v5	Kappa2	1,9
hu37D3–H9.v6	Kappa2	3,5
hu37D3–H9.v7	Kappa2	27,0
hu37D3–H9.v8	Kappa2	10,2
hu37D3–H9.v9	Kappa2	13,2
hu37D3–H9.v10	Kappa2	14,3
hu37D3–H9.v11	Kappa2	74,8
hu37D3–H9.v12	Kappa2	21,6
hu37D3–H9.v13	Kappa2	9,0
hu37D3–H9.v14	Kappa2	10,8
hu37D3–H9.v15	Kappa2	19,0
hu37D3–H9.v16	Kappa2	27,2
hu37D3–H9.v17	Kappa2	8,1

(continuación)

Variante de anticuerpo	Estructura de cadena ligera	K _D (nM)
hu37D3-H9.v18	Kappa2	13,4
hu37D3-H9.v19	Kappa2	55,7
hu37D3-H9.v20	Kappa2	36,9
hu37D3-H9.v21	Kappa2	38,1
hu37D3-H9.v22	Kappa2	36,6
hu37D3-H9.v23	Kappa2	81,1
hu37D3-H9.v24	Kappa2	56,6

Se caracterizaron adicionalmente las variantes de anticuerpos hu37D3-H9.v1, hu37D3-H9.v2, hu37D3-H9.v5 y hu37D3-H9.v6 mediante resonancia de plasmones de superficie con concentraciones de anticuerpos adicionales y tiempos más largos de asociación/disociación. Se analizaron estas variantes con un rango más amplio de concentraciones monoméricas de Tau humana (1,2, 3,7, 11,1, 11,1, 33,3, 100 nM) y aumento de los periodos de asociación (300 segundos) y disociación (1200 segundos). Se aplicó un modelo de unión 1:1 a los resultados (tabla 8).

- 10 Tabla 8: Análisis detallado de la cinética de unión de variantes seleccionadas a Tau humana mediante resonancia de plasmones de superficie

Variante de anticuerpo	Estructura de la cadena ligera	K _D (nM)
hu37D3-H9.v1	Kappa1	1,1 nM, 1,0 nM
hu37D3-H9.v2	Kappa1	1,2 nM
hu37D3-H9.v5	Kappa2	0,8 nM
hu37D3-H9.v6	Kappa2	1,4 nM

Se incorporó una mutación YTE (M252Y/S254T/T256E) en ciertos anticuerpos de IgG4. Se han descrito mutaciones del dominio de unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), tales como M252Y, S254T y T256E (YTE), para aumentar la unión a FcRn y así aumentar la vida media de los anticuerpos. Ver la solicitud de patente publicada estadounidense n.º 2003/0190311 y Dall'Acqua *et ál.*, *J. Biol. Chem.* 281:23514–23524 (2006).

Se humanizó el anticuerpo 125B11-H3 en estructuras consenso VH3 y Vk1. El injerto de la cadena pesada incluía residuos murinos en la posición 78 (sistema de numeración de Kabat). El injerto Vk1 incluía residuos murinos en las posiciones estructurales 43 y 87. La cadena ligera de 113F5-F7 fue también humanizada sobre la estructura Vk1, con residuos murinos adicionales en las posiciones estructurales 43 y 87. Se cotransfectaron cadenas pesadas (125B11) y cadenas ligeras (125B11 y 113F5-F7) de variantes humanizadas en combinaciones múltiples y se purificaron en formato de 96 pocillos, según lo descrito anteriormente. Luego se preseleccionaron las variantes humanizadas para determinar la afinidad con respecto al monómero de Tau humana empleando el kit de captura de IgG humana de Biacore, un chip CM5 serie S y un instrumento Biacore T200. Se diluyeron los anticuerpos hasta 2 µg/ml y se capturaron durante 15 segundos a 10 µl/min. Se monitorearon la asociación y disociación de 0, 100 y 500 nM de monómero de Tau humana en HBSP durante 180 s y 300 s, respectivamente, a una velocidad de flujo de 40 µl/min. Se aplicó un modelo de unión 1:1 a los resultados (tabla 9).

- 30 Tabla 9: Preselección de variantes de humanización 125B11-H3 y 113F5-F7 mediante resonancia de plasmones superficiales

Preselección de K _D (nM)		variante de humanización de cadena pesada 125B11					
		HC1	HC2	HC3	HC4	HC5	HC6
variante de humanización de cadena ligera 125B11	LC1	16, 19	18	18	15	85	–
	LC2	20	20	19	14	–*	NT
	LC3	21	23	20	15	–	–
	LC4	23	22	20	17	>100	>100
variante de humanización de cadena ligera 113F5-F7	LC1	57	61	54	44	–	–
	LC2	67	68	55	47	–	–
	LC3	61	64	54	47	>100	–
	LC4	71	77	65	51	–	–

* Unión mínima a monómero de tau.
NT, no analizado.

Las variantes hu125B11.v17 (HC3+LC1), hu125B11.v26 (HC4+LC2) y hu125B11.v28 (HC4+LC4) se seleccionaron para el análisis cinético de alta resolución con base en la preselección de afinidad (tabla 10). El anticuerpo 94B2-C1 fue humanizado sobre estructuras VH1 y Vk2. El injerto de cadena pesada también incluía residuos murinos en la posición 28, 29, 67, 69, 71 y 73 (sistema de numeración de Kabat). El injerto Vk2 incluía además residuos murinos en las posiciones estructurales 2, 36 y 46. Se expresaron, purificaron y preseleccionaron combinaciones de ocho cadenas pesadas y ocho cadenas ligeras mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés), según lo descrito para 125B11 anteriormente. Los resultados de la preselección de la SPR se muestran en la tabla 11. La variante hu94B2.v105 (variante de cadena pesada 94B2.HC1, variante de cadena ligera 94B2.LC13) se seleccionó para la caracterización mediante SPR detallada (tabla 11).

Tabla 10: Datos cinéticos para variantes de anticuerpos antiTau humanizados seleccionadas

Anticuerpo	Isotipo	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
hu125B11.v17	hIgG1	10,5	0,8 × 10 ⁵	0,8 × 10 ⁻³
hu125B11.v26	hIgG1	9,5	0,7 × 10 ⁵	0,7 × 10 ⁻³
hu125B11.v28	hIgG1	10,2	0,7 × 10 ⁵	0,7 × 10 ⁻³
hu94B2.v105	hIgG1	3,7	0,8 × 10 ⁵	0,3 × 10 ⁻³

Tabla 11: Preselección de variantes de humanización 94B2 mediante resonancia de plasmones superficiales

K _D (nM) de la preselección		Variante de humanización de cadena ligera 94B2:							
		LC9	LC10	LC11	LC12	LC13	LC14	LC15	LC16
Variante de humanización de cadena pesada 94B2:	HC1	3,8*	§	91,5	§	4,1 [¶]	§	104,0	§
	HC2	5,7	§	89,6	§	7,4	NT	99,6	§
	HC3	2,0	§	69,3	§	3,8	§	64,1	§
	HC4	61,9	§	§	§	64,1	§	§	§
	HC5	2,7	§	62,6	§	4,0	§	72,6	§
	HC6	0,9	§	70,1	§	3,0	§	74,1	§
	HC7	52,9	§	§	§	57,8	§	§	§
	HC8	1,0	§	44,3	§	2,4	§	51,5	§
*Media de n=3 repeticiones. [¶] hu94B2.v105. § Unión mínima observada a monómero de tau. NT, no analizado.									

Ejemplo 5: Análisis de estabilidad de anticuerpos antiTau humanizados

Identificación de inestabilidad química

Se sometieron a tensión térmica muestras de anticuerpos para simular la estabilidad durante la vida útil del producto. Se intercambiaron el amortiguador de las muestras en amortiguador de acetato 20 mM, pH 5,5 o amortiguador de fosfato, pH 7,4 y se diluyó hasta una concentración de 1 mg/ml. Un ml de muestra se sometió a tensión a 40 °C durante 2 semanas y se almacenó una segunda a -70 °C como control. Luego, ambas muestras fueron digeridas empleando tripsina, para crear péptidos que pudieran ser analizados empleando análisis de cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés) - espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). Para cada péptido en la muestra se obtuvo el tiempo de retención, en función de la información de la LC, así como también de la fragmentación de iones péptidos y masa precisa de alta resolución, (información de secuencias de aminoácidos), en la MS. Se tomaron cromatogramas de iones extraídos (XIC, por sus siglas en inglés) para los péptidos de interés (iones péptidos naturales y modificados) de los conjuntos de datos en una ventana de ±10 ppm y se integraron los picos para determinar el área. Se calcularon los porcentajes relativos de modificación para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividida entre (el área del péptido modificado más el área del péptido natural), multiplicado por 100. Luego se compararon estos porcentajes relativos entre el control (t=0) y las muestras sometidas a tensión (t=2 semanas). Los porcentajes mostrados representan el valor de control (t=0) restado del valor sometido a tensión (t=2 semanas). El análisis de desamidación de anticuerpos hu37D3-H9.v1 y hu37D3-H9.v5 condujo a la observación de que la secuencia N²⁸G²⁹N³⁰

(numeración de Kabat) dentro de la CDR-1 de la cadena ligera era susceptible a desamidación. El incremento en la $N^{28}G^{29}N^{30}$ desamidada se encontró que era del 16,5 % para hu37D3–H9.v1 y del 11 % para hu37D3–H9.v5.

Impacto de la desamidación sobre la unión del anticuerpo al antígeno

Para evaluar el impacto de la desamidación de N^{28} sobre la afinidad con respecto a la Tau humana, era deseable obtener dos muestras con estado de desamidación de N^{28} ampliamente separado. Se incubó Hu37D3–H9.v5 hlgG4.S228P a 40 °C durante dos semanas a una concentración de 1 mg/ml en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4. Se midió la desamidación del motivo $N^{28}G^{29}$ empleando LC–MS/MS. La muestra sometida a tensión, $t = 2$ semanas, tenía un aumento del 43,1 % de desamidación con relación a la muestra no sometida a tensión, $t = 0$. Se analizaron los anticuerpos sometidos a tensión y no sometidos a tensión para determinar la unión a Tau mediante resonancia de plasmones superficiales (Biacore), empleando el kit de captura de IgG humana de GE Biacore y un chip CM5 serie S. Se diluyeron hlgG hasta 2 μ g/ml en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) y se capturaron a una velocidad de flujo de 10 μ l/min durante 15 segundos (muestra t0) o 17 segundos (muestra t2). Se recolectaron los datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a concentraciones de 0, 3,1, 6,3, 12,5, 25, 50 y 100 nM en HBSP, empleando una velocidad de flujo de 30 μ l/min, una fase de asociación de 300 s y una fase de disociación de 1800 s. Entre ciclos, se regeneró la superficie empleando una inyección de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a 10 μ l/min. Se ajustó un modelo de unión 1:1 a los datos empleando los valores predeterminados del instrumento, incluido el ajuste local del parámetro «RI». Los resultados mostrados en la figura 6 y en la tabla 12 demuestran que, si bien el anticuerpo sometido a tensión se inmovilizó a niveles más altos que el anticuerpo no sometido a tensión en este experimento, la magnitud de la señal de unión a Tau (según lo representado por la magnitud del parámetro $R_{\text{máx}}$) era notablemente inferior. Después de la normalización del valor $R_{\text{máx}}$ para las diferencias en el nivel de captura, la muestra sometida a tensión ($t=2$ semanas) parecía mostrar aproximadamente la mitad de la capacidad de unión a Tau total de la muestra no sometida a tensión (indicado por una reducción del 56 % en el valor de $R_{\text{máx}}$ normalizado). La afinidad calculada no pareció cambiar: en este análisis, la diferencia en K_D entre las muestras de $t=0$ y las muestras de $t=2$ semanas era menos del 2 % ($K_D = 0,7$ nM para $t=0$ y $t=2$ semanas). Los resultados son coherentes con la muestra de $t=2$ semanas que contenía una población significativamente reducida de anticuerpos de alta afinidad.

Tabla 12: Unión relativa de muestras de hu37D3–H9.v5 sometidas a tensión y no sometidas a tensión a Tau monomérica mediante resonancia de plasmones superficiales

muestra de hu37D3–H9.v5 hlgG4.S228P	Nivel de ligando (UR)	$R_{\text{máx}}$ (UR)	$R_{\text{máx}}$ normalizada (= $R_{\text{máx}}$ / nivel de ligando)	Cambio en $R_{\text{máx}}$ Normalizada
Control ($t=0$)	102,9	47,7	0,46	N/C
Con tensión ($t=2$ semanas)	146,8	30,2	0,21	– 56 %

Impacto de la desamidación sobre unión del anticuerpo al antígeno y cálculo de « $R_{\text{máx}}$ normalizada»

Dado que se espera que la desamidación de asparagina dé como resultado productos de ácido aspártico y ácido isoaspártico (Bischoff R. & Kolbe H.V.J. (1994). *J. Chromat.* 5, 662, p261-278), se analizó el impacto del reemplazo de N^{28} con D^{28} (variante hu37D3–H9.v5 N28D) sobre la afinidad con respecto al monómero de Tau humana. Se evaluó la afinidad a 25 °C empleando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana de GE Biacore y un chip CM5 serie S. Se diluyó la hlgG hasta 2 μ g/ml en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) y se capturó a una velocidad de flujo de 10 μ l/min durante 22 segundos. Se recolectaron los datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a concentraciones de 0, 6,3, 12,5, 25, 25, 50, 100, 200 y 400 nM en HBSP, empleando una velocidad de flujo de 30 μ l/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre ciclos, se regeneró la superficie empleando una inyección de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a 10 μ l/min. Se ajustó un modelo de unión 1:1 a los datos y se calcularon las afinidades para hu37D3–H9.v5 y hu37D3–H9.v5,3 (también denominado en la presente hu37D3–H9.v5 N28D), calculadas empleando análisis cinético. Los parámetros empleados para el ajuste 1:1 incluyeron los valores predeterminados del instrumento de ajuste local para el parámetro «RI». Los resultados se muestran en la figura 7 y en la tabla 13.

La K_D calculada para la variante hu37D3–H9.v5 N28D fue 160×10^{-9} M, en comparación con $1,5 \times 10^{-9}$ M (media, $n = 4$ determinaciones intraexperimento) para hu37D3–H9.v5, analizado en las mismas condiciones. Por consiguiente, la conversión de N^{28} a D^{28} provoca una reducción >100 veces en la afinidad. Dada la afinidad comparativamente baja de la variante hu37D3–H9.v5 N28D y la cinética comparativamente rápida, nosotros razonamos que el análisis de la cinética de una mezcla de las variantes N^{28} y D^{28} estaría dominado por la población de mayor afinidad y que la presencia de las variantes de menor afinidad podría verse reflejada por una reducción en la $R_{\text{máx}}$ normalizada. Para validar este razonamiento, se comparó el perfil de unión a Tau de las variantes de anticuerpos hu37D3–H9.v5 y hu37D3–H9.v5 N28D con el de los dos anticuerpos mezclados entre sí en cantidades iguales. En comparación con

hu37D3–H9.v5 por sí solo, una mezcla 1:1 de hu37D3–H9.v5 y hu37D3–H9.v5 N28D dio como resultado una reducción del 45 % en la R_{máx} normalizada (tabla 13). Nuestra conclusión es que los cambios en la R_{máx} normalizada luego de la tensión térmica pueden ser indicativos de una población reducida de anticuerpos de alta afinidad en la muestra sometida a tensión. Nuestro razonamiento es que los cambios en la R_{máx} normalizada podrían, por ende, utilizarse para preseleccionar variantes de hu37D3–H9 para una mejor estabilidad.

Tabla 13: Cambios en la R_{máx} normalizada observados luego de la tensión térmica de hu37D3–H9.v5 y tras la mezcla de hu37D3–H9.v5 con el producto de desamidación anticipada hu37D3–H9.v5 N28D

Muestra	K _D (nM)	R _{máx} (UR)	Disminución en la R _{máx} normalizada en comparación con la referencia*	Comentarios
hu37D3–H9.v5 hIgG1	1,5 ± 0,2	76,1 ± 0,4	Referencia	Media +/- desviación estándar de cuatro análisis intraexperimento
hu37D3–H9.v5 N28D hIgG1	160	81,0	4 %	
hu37D3–H9.v5 & hu37D3–H9.v5 N28D hIgG1	2,0	46,4	45 %	Dos anticuerpos mezclados en una relación 1:1
hu37D3–H9.v5 hIgG4.S228P, t=0	1,5	68,8	3 %	Control para muestra sometida a tensión
hu37D3–H9.v5 hIgG4.S228P, t=2 semanas	1,5	33,4	54 %	Muestra sometida a tensión

* R_{máx} normalizada = R_{máx} (UR) /nivel de Ligando (UR). R_{máx} normalizada para el anticuerpo de referencia = 0,33 (media de cuatro determinaciones intraexperimento, desviación estándar < 0,01).

10 Optimización y selección de anticuerpos

Se evaluaron noventa variantes 37D3–H9 mediante Biacore para comparar su estabilidad funcional con o sin un período de tensión térmica de dos semanas a 40 °C. Las variantes incluyeron la mayoría de las mutaciones únicas del motivo N²⁸G²⁹N³⁰T³¹, mutantes dobles que contenían la mutación G29A, mutaciones dobles de Asn-28 y Tyr-32 que podrían reemplazar funcionalmente a estos a residuos unidos a hidrógeno, así como también todas las posibles permutaciones de los residuos 2, 4, 33 y 93, como residuos presentes en el anticuerpo 37D3–H9 original o la variante de residuos de línea germinal correspondiente. Adicionalmente, se analizaron las mutaciones en el contexto del residuo 1 que es Asp o Glu, lo cual no impacta sobre la afinidad o la estabilidad del residuo Asn-28.

Se expresaron los anticuerpos mediante transfección transitoria de células Expi293 en formato de 96 pocillos y se llevó a cabo la purificación automatizada en un sistema de manipulación de líquidos Tecan freedom EVO 200 con un cabezal MCA96 de 500 µL. Brevemente, se capturaron las IgG en 1 mL de cultivo, empleando columnas de punta que estaban empaquetadas a medida con 20 µL de resina MabSelect SuRe (Glygen Corp & GE Healthcare). Después del lavado con 1X PBS pH 7,4, se eluyeron las IgG en 160 µL de ácido fosfórico 50 mM pH 3 y se neutralizaron con 12 µL de 20X PBS pH 11. Las columnas de punta MabSelect SuRe se separaron en NaOH 0,1 M y se regeneraron con 1X PBS pH 7,4 para un uso consecutivo de hasta 15 veces. Los anticuerpos purificados en formato de 96 pocillos se normalizaron hasta 0,1 mg/ml, empleando un robot de manipulación de líquidos Hamilton Star. Las muestras «antes de la tensión» se mantuvieron a aproximadamente 4 °C y las muestras «después de la tensión» se incubaron a 40 °C durante dos semanas en una máquina de PCR. Se comparó la estabilidad funcional de las variantes llevando a cabo experimentos de cinética de resonancia de plasmones superficiales con las preparaciones de anticuerpos «antes de la tensión» y «después de la tensión». Se evaluaron los anticuerpos empleando un chip CM5 serie S de captura de anticuerpos humanos, generado empleando el kit de captura de IgG humana de GE Biacore y un instrumento Biacore T200. Se inmovilizaron los anticuerpos diluidos hasta 2 µg/ml empleando un tiempo de inyección de 15 segundos y una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se monitoreó la unión a monómero de Tau a 0 nM, 26,5 nM y 265 nM, a 25 °C, empleando una velocidad de flujo de 40 µl/min, para una fase de asociación de 180 segundos, seguida por una fase de disociación de 300 segundos. Las muestras se procesaron en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (HBSP), empleando un formato de cinética de múltiples ciclos. Se analizaron los datos empleando un programa informático BIAevaluation, que se ajusta a un modelo de unión 1:1. Los valores de afinidad resultantes (K_D) se muestran en la figura 8A–8D. También se calculó un índice de estabilidad, empleando el razonamiento de que se espera que los anticuerpos con afinidad comprometida (debido, por ejemplo, a la desamidación de residuos claves) contribuyan de igual manera al nivel de captura de IgG («nivel del ligando»), aunque se espera que contribuyan menos

a la unión medida a Tau y que esto se vería reflejado en el valor derivado experimentalmente para R_{máx}. Para dar cuenta de las variaciones en la cantidad de cada anticuerpo capturado, se normalizó la R_{máx} para el nivel de captura de anticuerpos (según lo medido mediante el «nivel de ligando», unidades de respuesta inmovilizadas durante la captura de los anticuerpos). Por lo tanto, se calcula la R_{máx} normalizada como la R_{máx} experimental (unidades=UR) dividida entre el «nivel de ligando» (resultado de la evaluación que representa las UR capturadas durante la etapa de captura de hlgG, unidades=UR) y se calcula el índice de estabilidad en este caso como R_{máx} normalizada (después de la tensión) dividida entre la R_{máx} normalizada (antes de la tensión).

Se expresaron los anticuerpos seleccionados mediante transfección transitoria de células CHO y se purificaron. Luego, se sometieron a tensión los anticuerpos durante dos semanas a 1 mg/ml y se analizó la desamidación mediante LC-MS/MS, empleando mapeo de péptidos triptico RCM con reducción de DTT, «casquete» de IAA y digestión a pH 8,2. Los resultados (tabla 14) demostraron que la variante hu37D3-H9.v28.A4 tenía menor susceptibilidad a la desamidación en el motivo N²⁸G²⁹N³⁰. La reducción de la desamidación de hu37D3-H9.v28.A4 fue inesperada, ya que el residuo no está situado en la proximidad inmediata del residuo Asn-28 (figura 9) y no queda claro cómo la mutación F33L podría estabilizar Asn-28.

Tabla 14: Estabilidad de las variantes hu37D3-H9.v28.A4 en ensayos de tensión para desamidación

Anticuerpo		Condiciones de tensión térmica	Aumento en la desamidación de N ²⁸ G ²⁹ N ³⁰ de cadena ligera
hu37D3-H9.v1	hlgG1	40 °C en amortiguador de acetato, pH 5,5	16,5 %
hu37D3-H9.v5	hlgG1	40 °C en amortiguador de acetato, pH 5,5	11 %
hu37D3-H9.v28.A4	hlgG1	40 °C en amortiguador de acetato, pH 5,5	N ²⁸ : 2,8 % N ³⁰ : 0,2 %
		37 °C en PBS pH 7,4	N ²⁸ : 5,3 % N ³⁰ : ND
	hlgG4.S228P.YTE	40 °C en amortiguador de acetato, pH 5,5	N ²⁸ : 0 % N ³⁰ : 0 %
		37 °C en PBS pH 7,4	N ²⁸ : 10,4 % N ³⁰ : 2,0 %

Ejemplo 6: Selección y caracterización de anticuerpos antiTau humanizados

Selección y caracterización de anticuerpos: unión a la proteína Tau humana

Se evaluó la afinidad de los anticuerpos seleccionados a 25 °C, empleando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana de GE Biacore y un chip CM5 serie S. Se diluyó la hlgG hasta 0,25 µg/ml en HEPES 10 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) y se capturó a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 150 segundos. Se recolectaron los datos cinéticos para monómero de Tau humana inyectados a concentraciones de 0, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33 y 100 nM en HBSP, empleando una velocidad de flujo de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre ciclos, se regeneró la superficie empleando dos inyecciones en secuencia de 30 segundos de MgCl 3 M a 10 µl/min. Se ajustaron los datos a un modelo de unión 1:1 (tabla 15).

Tabla 15: Datos cinéticos para variantes seleccionadas de anticuerpos antiTau humanizados

Anticuerpo	Isotipo	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
hu37D3-H9.v28.A4	hlgG1	1,5	6,9 × 10 ⁵	1,1 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v5	hlgG1	1,0	7,5 × 10 ⁵	0,8 × 10 ⁻³

(continuación)

Anticuerpo	Isotipo	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
hu37D3-H9.v5	hlgG4.S228P	1,3	7,1 × 10 ⁵	0,9 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v1	hlgG4.S228P	2,0	6,7 × 10 ⁵	1,3 × 10 ⁻³

Caracterización de anticuerpos: Unión a proteína Tau humana en formato hlgG4.S228P.YTE

- 5 Se evaluó la afinidad a 25 °C empleando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de FAb humanos de GE Biacore y un chip CM5 serie S. Se diluyó hlgG hasta 0,5 µg/ml en HEPES 10 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) y se capturó a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 180 segundos. Se recolectaron los datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a concentraciones de 0, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 11, 33 y 100 nM en HBSP, utilizando una velocidad de flujo de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre ciclos, se regeneró la superficie empleando dos inyecciones en secuencia de 60 segundos de glicina 10 mM pH 2,1. Se ajustaron los datos a un modelo de unión 1:1. Los datos cinéticos se muestran en la tabla 16.

15 Tabla 16: Cinética de unión de hu37D3-H9.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE a Tau humana monomérica mediante resonancia de plasmones superficiales

Anticuerpo	Preparación de anticuerpos	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
hu37D3-H9.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE	Prep 1	1,4	6 × 10 ⁵	9 × 10 ⁻⁴
	Prep 2	1,4	6 × 10 ⁵	9 × 10 ⁻⁴

Caracterización de anticuerpos: Unión a proteína Tau de mono cynomolgus

- 20 Se evaluó la afinidad a 25 °C empleando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana de GE Biacore y un chip CM5 serie S. Se diluyó hlgG hasta 2 µg/ml en HEPES 10 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (amortiguador de procesamiento, HBSP) y se capturó a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 15 segundos. Se recolectaron los datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a un mínimo de cinco concentraciones distintas a cero diferentes entre 1,2 y 100 nM, con una concentración de replicación. Se evaluó la cinética utilizando una velocidad de flujo de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre ciclos, se llevó a cabo una inyección de regeneración de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Los resultados se ajustaron a un modelo de unión 1:1. En la tabla 17 se muestran los datos cinéticos.

25 Tabla 17: Afinidad de anticuerpos antiTau humanizados para Tau de mono cynomolgus monomérica

Anticuerpo	Nivel de ligando (UR)	Rmáx (UR)	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
hu37D3.v28.A4	113,9	62,6	0,7	17 × 10 ⁵	1 × 10 ⁻³
hu37D3.v28.F1	126,9	61,2	1,3	12 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻³
hu37D3.v28.A12	162,6	85,2	1,0	17 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻³
hu37D3.v29,2	168,6	86,0	1,4	17 × 10 ⁵	2 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v5	125,1	55,5	0,6	15 × 10 ⁵	1 × 10 ⁻³
hu37D3-H9.v1	130,2	51,7	0,8	20 × 10 ⁵	1 × 10 ⁻³

30

Los anticuerpos humanizados hu37D3.v28.A4 y hu37D3.v28.F1 también se unen a Tau fosforilada (pTau).

Ejemplo 7: Farmacocinética de anticuerpo antiTau

- 35 Para evaluar la farmacocinética del anticuerpo antiTau 37D3-H9 mlgG2a *in vivo*, se les administró a ratones C57BL6 conscientes una sola inyección de bolo intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP) en una dosis de 10 mg/kg. En diversos momentos hasta 28 días posdosis, se recolectaron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpo antiTau.
- 40 Se midieron las concentraciones del anticuerpo dosificado en plasma de ratón con un ELISA genérico, empleando una cubierta de anticuerpo antimulgG2a de ratón, seguido por la adición de muestras de plasma comenzando a una

dilución de 1:100 y terminando mediante adición de un conjugado de anti-mulG2a de ratón-biotina y luego estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante para detección. El ensayo tenía un rango de curva estándar de 1,56-200 ng/mL y un límite de detección de 0,16 µg/mL. Los resultados por debajo de este límite de detección fueron informados como menos de lo reportable (LTR, por sus siglas en inglés).

5 La figura 10 muestra los resultados del análisis farmacocinético para mlgG2a antiTau 37D3-H9. La mlgG2a antiTau 37D3-H9 tuvo exposición y depuración similares en ratones C57BL/6 de tipo salvaje a anticuerpos de control del isotipo, con una depuración de 6,31 mL/día/kg.

10 Para evaluar la farmacocinética de la mlgG2a antiTau 94B2-C1 y la mlgG2a antiTau 125B11-H3 *in vivo*, se administró una única inyección de bolo IP de anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg a ratones C57BL/6 conscientes. En diversos momentos hasta 28 días posdosis, se recolectaron muestras de plasma hasta concentraciones de anticuerpo antiTau determinadas.

15 Las concentraciones del anticuerpo dosificado en plasma de ratón se midieron con un ELISA genérico, empleando una cubierta de anticuerpo antimulG2a de ratón, seguido por la adición de las muestras de plasma comenzando a una dilución de 1:100 y terminando mediante adición de un conjugado de anti-mulG2a de ratón-biotina, y luego estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante para detección. El ensayo tenía un rango de curva estándar de 0,78-100 ng/mL y un límite de detección de 0,078 µg/mL. También se midieron las concentraciones con un ELISA específico empleando Tau recombinante como la cubierta, seguido por la adición de muestras de plasma comenzando a una dilución de 1:10 y terminando mediante adición de antimulG2a de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante para detección. El ensayo tuvo un rango de curvas estándar de 0,078-10 ng/mL y un límite de detección de 0,0008 µg/mL. Los resultados por debajo de este límite de detección fueron informados como menos de lo reportable (LTR).

25 Los resultados de esos experimentos se muestran en las figuras 16 y 17. La mlgG2a antiTau 94B2 tuvo exposición y depuración similares en ratones C57BL/6 de tipo salvaje a un anticuerpo de control de isotipo cuando se analizaron las concentraciones empleando un ensayo genérico, pero exposición inferior y depuración más rápida cuando se analizaron las concentraciones empleando un ensayo específico. Ver la figura 16. La depuración determinada mediante el ensayo genérico fue de 4,06 mL/día/kg y la determinada mediante el ensayo específico fue de 7,53 mL/día/kg. Estos resultados sugieren que el anticuerpo puede experimentar cambios *in vivo* con el transcurso del tiempo que comprometen su capacidad de reconocer su objetivo. La mlgG2a antiTau 125B11-H3 tuvo exposición y depuración similares en ratones C57BL/6 de tipo salvaje a un anticuerpo de control de isotipo, sin importar qué ensayo generó las concentraciones. Ver la figura 17. La depuración determinada mediante el ensayo genérico es de 4,96 mL/día/kg y la determinada mediante el ensayo específico es de 4,90 mL/día/kg.

La tabla 18 muestra los parámetros farmacocinéticos para los anticuerpos antiTau 37D3-H9, 94B2-C1 y 125B11-H3 en ratones

40 Tabla 18: Parámetros farmacocinéticos para anticuerpos antiTau

	Vía de administración	Ensayo	C _{máx} (µg/mL)	AUC _{inf} (µg/mL*día)	CL o CL/F (mL/día/kg)
37D3-H9	IV	Genérico	185	1590	6,31
	IP	Genérico	107	1680	6,76
94B2-C1	IP	Genérico	151	2460	4,06
	IP	Específico	141	1330	4,91
125B11-H3	IP	Genérico	127	2020	4,96
	IP	Específico	151	2040	4,90

45 Para evaluar la farmacocinética de los anticuerpos hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P y hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE *in vivo*, monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) conscientes recibieron administraciones de una inyección de bolo IV única a una dosis de 1 mg/kg. En distintos momentos hasta 49 días posdosis, se recolectaron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpo antitau.

50 Las concentraciones del anticuerpo dosificado en plasma de mono se midieron con un ELISA genérico empleando una cubierta de anticuerpo anti-IgG humana de oveja, seguido por la adición de muestras plasmáticas comenzando a una dilución de 1:100 y terminando mediante adición de IgG anti-humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante para detección. El ensayo tuvo un rango de curvas estándar de 0,156-20 ng/mL y un límite de detección de 0,02 µg/mL. Los resultados por debajo de este límite de detección fueron informados como menos de lo reportable (LTR).

55 La figura 11 muestra los resultados del análisis farmacocinético para hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P y hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE. En la figura 11, cada conjunto de puntos de datos representa un animal y las líneas representan el promedio para todos los animales en el grupo de ensayo de anticuerpos. La tabla 19 muestra los parámetros farmacocinéticos para hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P y hu37D3.v28.A4 hlgG4-S228P.YTE en monos cynomolgus.

Tabla 19: Parámetros farmacocinéticos para hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P y hu37D3.v28.A4 hlgG4–S228P.YTE en monos cynomolgus

Anticuerpo	Ensayo	C _{máx} (μg/mL)	AUC _{inf} (día*μg/mL)	CL (mL/día/kg)	V _{ss} (mL/kg)
anti-gD hlgG4	Genérico	34,6	386	2,66	55,5
hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P	Genérico	35,7 ± 2,59	559 ± 209	1,97 ± 0,743	71,9 ± 16,0
	Específico	35,4 ± 1,37	419 ± 89,9	2,47 ± 0,581	60,8 ± 3,49
hu37D3.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE	Genérico	34,5 ± 5,23	578 ± 43,5	1,74 ± 0,125	60,5 ± 1,87
	Específico	33,5 ± 2,72	520 ± 39,0	1,93 ± 0,139	56,5 ± 4,90

Ejemplo 8: Caracterización adicional de epítomos de anticuerpo A anti-Tau

Tras una comparación de unión de 37D3-H9 a monómero de Tau biotinilado y péptido biotinilado (MAPT₁₀₋₂₄), también se evaluó la unión de 37D3-H9 a péptidos biotinilados adicionales. Se recubrieron microplacas de 96 pocillos Nunc maxisorp a 4 °C durante > 12 horas con neutravidina diluida hasta 2 μg/ml en amortiguador de carbonato sódico 50 mM, pH 9,6. Se llevaron a cabo todas las incubaciones subsiguientes a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas se bloquearon con amortiguador de bloqueo Superblock™ (PBS) (Thermo Fisher Scientific) durante dos horas y luego se lavaron exhaustivamente con PBS, polisorbato 20 al 0,05 %. Luego los pocillos fueron expuestos a péptidos Tau biotinilados (tabla 20) o monómero Tau biotinilado con etiqueta Avi a 1 μg/ml durante una hora y se lavaron como anteriormente. Se sintetizaron los péptidos empleando química Fmoc de fase sólida convencional (ver, p. ej., Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University Press: Nueva York, 2000). Los anticuerpos de mlgG2a 37D3-H9 y hlgG1 hu37D3–H9.v5, diluidos en serie de 500 nM a 50 pM en amortiguador de bloqueo Superblock™ (PBS) al 90 %, se dejaron unir a los pocillos recubiertos con Tau biotinilado durante 90 minutos. Se lavaron los pocillos como anteriormente y se detectó el anticuerpo unido con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Invitrogen/Life Technologies) diluido 1/1000 en amortiguador de bloqueo Superblock™ (IgG antiratón de conejo o IgG anti-humana de cabra (H+L), respectivamente). Después de veinte minutos, se lavaron los pocillos como anteriormente y se desarrolló una señal con sustrato de 2 componentes de micropocillos TMB (KPL). Se pararon las reacciones mediante la adición de ácido fosfórico 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de placas SpectraMax M2.

Tabla 20: Secuencias de péptidos

Secuencia MAPT	Secuencia de péptidos	SEC ID NO:
MAPT(10–24)	VMEDHAGTYGLGDRK	592
MAPT(2–24)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRK	593
MAPT(2–34)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQD	594
MAPT(10–44)	VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK	595

Los resultados de ese experimento se muestran en la figura 12A-12C. La figura 12A muestra la unión de cada uno de los anticuerpos indicados para los péptidos indicados. Los anticuerpos 37D3-H9 y 94B2-C1 mostraron fuerte unión al fragmento 10-24 en ese experimento y el anticuerpo 94B2-C1 también mostró una fuerte unión al fragmento 1-15. Los anticuerpos 19F8-C11 y 123E9-A1 mostraron fuerte unión al fragmento 19-33, mientras que el anticuerpo 89F4-A1 mostró fuerte unión a los fragmentos 28-42 y 37-51. Ver la figura 12A. Los anticuerpos de mlgG2a 37D3–H9 y de hlgG1 hu37D3–H9.v5 mostraron fuerte unión a los fragmentos de Tau 2-24 y 2-34 y unión más débil al fragmento 10-24. Ver las figuras 12B y 12C. Estos resultados sugieren que los anticuerpos de mlgG2a 37D3–H9 y hlgG1 hu37D3–H9.v5 se unen a un epítipo de Tau dentro de los aminoácidos 2-24 de la proteína madura.

En un experimento de sustitución con barrido de alanina, se descubrió que las mutaciones Y18A y L20A anulan la unión del anticuerpo murino 37D3-H9 a un fragmento de Tau (fragmento 2-21), lo que sugiere que el anticuerpo hace contacto con estos residuos de tau. Empleando una serie de péptidos desfasados de 15meros, se descubrió que el anticuerpo murino 37D3-H9 mostraba unión similar al fragmento 9-23 que al fragmento 10-24 y también mostraba unión moderada a los fragmentos 7-21, 8-22 y 11-25.

Ejemplo 9: Caracterización basada en células de anticuerpos humanizados 37D3-H9

Métodos

Cultivo primario de hipocampo y microglías y cocultivo de hipocampo–microglías

Se prepararon neuronas de hipocampo primarias disociadas de ratones embrionicos C57BL/6N de tipo salvaje del día 16-17. Se colocaron en placas células sobre portaobjetos de cámara de 8 pocillos recubiertas con PDL/laminina (Biocoat, 354688 Corning) a 25000 células/pocillo. Las células se colocaron en placas y se mantuvieron en NbActiv4 (BrainBits) y se reemplazó la mitad del medio dos veces por semana. Se aplicaron Tau recombinante y anticuerpos al cultivo en 18 divisiones celulares.

Para el cultivo de microglía, se disociaron cortezas e hipocampos de ratones C57BL/6N de día 1-2 posnatal y se cultivaron en FBS al 10 % en DMEM en frascos de cultivo de 225 mm² durante 10-12 días. Se agitaron suavemente los frascos de cultivo para disociar la microglía y las células en FBS al 10 % en DMEM se volvieron a colocar en placas sobre portaobjetos de cámara de 8 pocillos recubiertas con PDL/laminina a 30000 células/pocillo para toma de imágenes o placas de 48 pocillos sin recubrir (3548, Corning) a 100000 células/pocillo para ensayo de citoquina. 4-5 horas después de la colocación en placas, se cambiaron las células a DMEM de bajo contenido de glucosa y libre de suero y se mantuvieron durante toda la noche antes del tratamiento con Tau recombinante y anticuerpos.

Se prepararon cocultivos de hipocampo–microglía colocando nuevamente en placas microglía disociada de frascos de cultivo de 225 mm² sobre 18 neuronas primarias de hipocampo DIV en cámaras de portaobjetos de 8 pocillos (12500 microglías y 25000 neuronas por cada pocillo). Se trataron los cocultivos con Tau recombinante y anticuerpos 4 horas después de la colocación en placas de las microglías.

Tratamiento in vitro de Tau recombinante y anticuerpos

Para 18 cultivos de hipocampo DIV o cocultivos de hipocampo-microglía, Tau oligomérica humana recombinante y anticuerpos (500 nM cada uno en una relación 1:1) o controles se preincubaron en medio de cultivo neuronal (medio acondicionado de cultivo de hipocampo 18DIV:NbActiv4 fresco a 1:1) durante 1 hora a 37 °C, antes de ser agregados a las células. Se incubaron las células con la mezcla de tau-anticuerpo o control en el medio durante 72 horas (cultivo de hipocampo) o 48 horas (cocultivo de hipocampo-microglía). Se lavaron las células con PBS tres veces antes de la fijación.

Para el cultivo de microglías, se preincubaron Tau oligomérica humana recombinante y anticuerpos o controles a 125 nM cada uno (inmunocitoquímica/toma de imágenes) o 250 nM cada uno (ensayo con citoquinas) en DMEM de bajo contenido de glucosa, en ausencia de suero durante 1 hora a 37 °C con anterioridad a la adición a las células. Para la inmunocitoquímica/ toma de imágenes, se incubaron las células con la mezcla de Tau-anticuerpo o con los controles durante 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS antes de la fijación. Para el ensayo con citoquinas, se incubaron las células con la mezcla de Tau-anticuerpo o control durante 24 horas y se recolectó el medio de cada pocillo para el ensayo con citoquinas.

Inmunocitoquímica, imágenes y cuantificación

Se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS durante 10 minutos. Se utilizó suero de burro al 10 % para el bloqueo y se incubaron las células con anticuerpos primarios en PBS durante toda la noche a 4 °C, seguido por incubación con anticuerpos secundarios etiquetados con fluoróforo Alexa contra especies apropiadas desarrolladas en burro (Invitrogen). Los anticuerpos primarios empleados eran antiTau (DAKO), anti-Tau humana de conejo, desarrollados contra la región de extremo N de Tau humana que abarca los aminoácidos 11-24, antiMAP2 (ab5392, Abcam) y anti-Iba-1 (ab5076, Abcam). Los portaobjetos se montaron con Prolong Gold DAPI (P36935, Invitrogen) y cubreobjetos n.º 1.

Se realizó una toma de imágenes fluorescentes confocal con un LSM780 (Carl Zeiss, Inc.), empleando el programa informático Zen 2010 (Carl Zeiss, Inc.). Para la toma de imágenes de cultivos de hipocampo y cocultivos de hipocampo-microglías, se recolectaron 5 pilas de imágenes z en intervalos de 0,98 µm, empleando objetivos M27 Plan Apochromat 20x/0,8. Para el ensayo de fragmentación de MAP2, se creó una proyección z de intensidad máxima para una pila de imágenes y se analizó empleando Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se utilizaron un filtro mediano y deconvolución del vecino más próximo para la reducción del ruido. Se analizaron las longitudes de cuerpos celulares y neuritas empleando el módulo de crecimiento neurítico, seguido por el procesamiento morfológico. Se normalizaron los fragmentos con menos de 15 píxeles (6,225 µm) hasta la longitud total de la señal, para obtener una medida de la fragmentación de MAP2.

Se tomaron imágenes de las microglías con el objetivo M27 α–Plan Apochromat 100x/1,46. Se realizó la cuantificación de la captación de Tau recombinante en las células con la imagen J (1,43 u, 64 bits, Instituto nacional de la salud). Se dibujaron manualmente ROI del área celular empleando la señal Iba-1 como referencia. Se midieron el área y la intensidad integrada de la inmunorreactividad de ROI con respecto a Tau para obtener la inmunorreactividad de Tau normalizada en el área. Se llevaron a cabo todos los análisis sin conocer las condiciones experimentales.

Resultados

Los resultados del experimento se muestran en la figura 13A-13B. Como se muestra en la figura 13A, los anticuerpos con función efectora completa no protegieron contra la toxicidad de Tau en los cocultivos de neuronas- microglías. La figura 13B muestra imágenes de cocultivos de neuronas- microglías en contacto con Tau oligomérica y anticuerpos (paneles inferiores). Los anticuerpos de hlgG4 37D3-H9 y hlgG1 hu37D3-H9 (N297G), los cuales carecen de función efectora, fueron protectores contra la toxicidad de tau, mientras que hlgG1 37D3-H9 no lo fue.

Ejemplo 10: Reducción dependiente de la dosis de la patología de Tau en ratones Tg Tau a los cuales se les administra IgG2a 37D3-H9 o IgG2a DANG 37D3-H9

Se mantuvieron ratones transgénicos con expresión de Tau humana P301L con el promotor Thy1 (Tau P301L-Tg) sobre un fondo de C57BL/6N (Charles River). Se asignaron ratones compañeros de camada Tau P301L-Tg y de tipo salvaje a grupos de tratamiento y recibieron dosis una vez a la semana por vía intraperitoneal (i.p.) de IgG2a-control (antigp120) a 30 mg/kg, IgG2a 37D3-H9 WT anti-Tau a 3, 10 o 30 mg/kg, IgG2a DANG 37D3-H9 anti-Tau a 3, 10 o 30 mg/kg. DANG se refiere a mutaciones D265A/N297G en la IgG2a, las cuales anulan la función efectora. Se prepararon todas las soluciones de dosificación de anticuerpo en histidina 10 mM pH 5,8, sacarosa al 6 %, Tween 20 al 0,02 % en una concentración de 10 mg/ml. El tratamiento comenzó a las 13 semanas de edad. Los grupos de ratones en el estudio *in vivo* eran machos y agrupados en 3 cohortes. Además, se recolectaron 3 ratones tauP301L-Tg a la edad de 3 meses, sin pasar por ningún tratamiento, a fin de determinar el nivel de referencia de la patología en el momento del inicio del tratamiento.

Para recolectar tejido, los ratones fueron anestesiados con tribromoetanol al 2,5 % (0,5 ml por 25 g de peso corporal) y fueron sometidos a perfusión transcardiaca con PBS. Se recogieron los cerebros y se bisecaron. Los hemisferios derechos se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante toda la noche a 4 °C, luego se transfirieron a solución salina amortiguada con fosfato con anterioridad al procesamiento para inmunohistoquímica. Los hemisferios izquierdos fueron subdisecados sobre hielo, luego se congelaron a -80 °C para el análisis bioquímico. Se tomaron muestras de la cola de todos los ratones para confirmar los genotipos.

Hemicerebros se incrustaron en forma múltiple en una matriz de gelatina empleando bloques MultiBrain® (NeuroScience Associates, Knoxville, TN) y se cortaron coronalmente a 25 µm de espesor. Dentro de cada bloque, la posición del cerebro se asignó de forma aleatoria con relación al genotipo y al tratamiento. Cortes de flotación libre de hemicerebros de ratones individuales o de bloques MultiBrain® se tificaron según lo descrito previamente (Le Pichon et al., 2013, PLoS One, 8(4): e62342), pero con lavados en PBS en lugar de solución salina amortiguada con Tris e incubaciones de anticuerpos primarios a 4 °C en lugar de temperatura ambiente. El anticuerpo primario era anti-pTau212/214 de conejo (generado internamente; 0,01 µg/ml). Para evitar una elevada tinción del fondo, en el caso de los anticuerpos primarios de ratón que eran específicos del subtipo, empleamos el correspondiente anticuerpo secundario específico del subtipo (por ejemplo, IgG3 anti-ratón biotinilada, Bethyl A90-111B).

Se tomaron imágenes de los portaobjetos inmunohistoquímicamente teñidos, empleando el sistema de barrido de portaobjetos enteros Leica SCN400 (Leica Microsystems; Buffalo Grove, IL) a una amplificación de 200x, con una resolución de 0,5 µm/píxeles. Se marcaron manualmente las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) en 4 niveles de hipocampo coincidentes por cada animal y se cuantificó la cantidad de tinción en estas ROI de forma automatizada, empleando los dos criterios de valoración descritos a continuación. Todos los análisis de las imágenes se realizaron sin conocer cuáles eran los grupos de tratamiento y de genotipo. Para el análisis positivo del área de píxeles para la cuantificación de manchas IHC, se analizaron las imágenes digitales de los cortes de cerebro etiquetados con anticuerpo, según lo descrito anteriormente (Le Pichon et al., 2013). Se calculó el porcentaje de área coloreada normalizando los píxeles positivos totales según área total de píxeles de la ROI. Se calculó la intensidad integrada empleando la ley de Beer-Lambert, $\text{absorbancia} = -\log(\text{intensidad luminosa transmitida} / \text{intensidad luminosa incidente})$, para las áreas de píxeles positivos solamente.

Los resultados de ese experimento se muestran en la figura 14. La administración de IgG2a WT 37D3-H9 antiTau o IgG2a DANG 37D3-H9 antiTau dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de pTau212/214 en el hipocampo.

Ejemplo 11: variantes kappa 1 de 37D3-H9 humanizada

Variantes de anticuerpos humanizados basados en hu37D3-H9.v1, que tiene una cadena ligera kappa 1, se prepararon y se analizaron para determinar la estabilidad de N²⁸. En la figura 18 se muestra un alineamiento de la región variable de cadena ligera de las tres variantes analizadas con hu37D3-H9.v1. Las tres variantes difieren entre sí en la región variable de cadena ligera: hu37D3.v39 contiene la mutación F33L, hu37D3.v40 contiene la mutación G29T y hu37D3.v41 contiene la mutación N30Q.

Se sometieron a tensión térmica las muestras de anticuerpos, de la siguiente manera. Se intercambió el amortiguador de las muestras a acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 5,5 y se diluyó hasta una concentración de 1 mg/ml. Se sometió a tensión un ml de muestra a 40 °C durante 2 semanas y se almacenó una segunda a -70 °C como control. Luego, ambas muestras se digirieron utilizando tripsina para crear péptidos que pudieran ser analizados empleando análisis de cromatografía líquida (LC) – espectrometría de masas (MS). Para cada péptido en la muestra se obtuvo el tiempo de retención, según la LC, así como también según la información de la fragmentación iónica de péptidos y masa exacta a alta resolución (información de secuencia de aminoácidos), en la MS. Se tomaron cromatogramas de iones extraídos (XIC) para los péptidos de interés (iones de péptidos naturales y modificados) a partir de los conjuntos de datos en una ventana de ±10 ppm y se integraron los picos para determinar el área. Se calcularon los porcentajes relativos para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividida entre el (área del péptido modificado más el área del péptido natural) y multiplicado por 100. Luego, se compararon estos porcentajes relativos entre el control (t=0) y las muestras sometidas a tensión (t=2semanas). Los porcentajes mostrados representan el valor de control (t=0) restado del valor con tensión (t=2 semanas). En la tabla 21 se muestran los

resultados. Los resultados demuestran que la mutación F33L es eficaz para reducir la desamidación en una cadena ligera humanizada kappa 1.

Tabla 21 – Estabilidad de las variantes de hu37D3-H9.v1 en ensayos de tensión para desamidación

Anticuerpo		Incremento en la desamidación de N ²⁸ G ²⁹ N ³⁰ de cadena ligera
hu37D3.v39	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ : 2,7 % N ³⁰ : Sin incremento significativo detectado
hu37D3.v40	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ : 12,1 % N ³⁰ : 3,9 %
hu37D3.v41	hlgG4.S228P.YTE	N ²⁸ : 6,0 % N ³⁰ : Residuo reemplazado con glutamina

Se midió la afinidad de las variantes de anticuerpos humanizados a 25 °C, empleando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de Fab humano GE Biacore, y un chip CM5 serie S. Se diluyeron los anticuerpos hasta 1 µg/ml en HBSP (HEPES 10 mM, pH7,4, NaCl, 150 mM, Tween 20 al 0,05 %) y se capturaron a una velocidad de flujo de 10 µl/min durante 180 segundos. Se recolectaron los datos cinéticos para el monómero de Tau humano inyectado a 1,2, 3,7, 11, 33 y 100 nM en HBSP, empleando la metodología de cinética de ciclo único y una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se inyectó cada concentración de monómero de Tau durante un período de 3 minutos y se monitoreó la disociación durante diez minutos. Entre ciclos, se regeneró la superficie con dos inyecciones de un minuto en secuencia de glicina 10 mM pH 2,1. Se ajustaron los datos a un modelo de unión 1:1, empleando el programa informático BIAEvaluation. Se analizó cada anticuerpo dos veces dentro del experimento; los datos en la tabla 22 se muestran como rango ± media.

Tabla 22: Afinidades de variantes de hu37D3-H9.v1 con respecto a Tau monomérica

	K _D (nM)	k _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)
hu37D3.v1 hlgG1	2,3 ± 0,3	6 ± 0,5 x10 ⁵	1 ± 0,1 x10 ⁻³
hu37D3.v1 hlgG4	2,3 ± 0,3	6 ± 0,2 x10 ⁵	1 ± 0,1 x10 ⁻³
hu37D3.v39 hlgG4.YTE	1,9 ± 0,2	6 ± 0,6 x10 ⁵	1 ± 0,02 x10 ⁻³
hu37D3.v40 hlgG4.YTE	4,4 ± 0,5	8 ± 0,9 x10 ⁵	3 ± 0,02 x10 ⁻³
hu37D3.v41 hlgG4.YTE	5,4 ± 0,3	9 ± 1,2 x10 ⁵	5 ± 0,3 x10 ⁻³

Ejemplo 12: Farmacocinética y farmacodinámica de hlgG4-S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en monos cynomolgus

Para evaluar la farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 *in vivo*, se administró a cinco monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) conscientes por grupo una única inyección por bolo IV a una dosis de 50 mg/kg en la primera fase. Se utilizó hlgG4 anti-gD como control, también a una dosis de 50 mg/kg. En diversos momentos hasta 35 días posdosis, se recolectaron muestras de plasma y LCR para determinar las concentraciones de anticuerpos antitau. Después de la recolección final de las muestras, se dejó que los animales se recuperaran durante 63-64 días antes del inicio de la segunda fase. En la segunda fase, los 15 animales de la primera fase, más 3 animales adicionales, fueron divididos en dos grupos; el primer grupo (n=9) recibió el anticuerpo hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y el segundo grupo (n=9) recibió el anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, ambos a 50 mg/kg. Se recolectaron cerebros de 4 o 5 animales por grupo a los 2 días y 10 días posdosis.

Se midieron anticuerpos de IgG4 humana en plasma, LCR y homogenado cerebral de monos cynomolgus (descrito más adelante) con un ELISA, utilizando una cubierta de anticuerpo adsorbida de mono anti-IgG humana de oveja, seguido por la adición de muestras plasmáticas comenzando a una dilución de 1:100, con las muestras de LCR comenzando a una dilución de 1:20, o con las muestras de homogenado cerebral comenzando a una dilución de 1:10, y se terminó mediante adición de un anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante de mono adsorbida para detección. Se desarrolló el color empleando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y se neutralizó empleando ácido fosfórico 1 M. Se leyeron las muestras a 450/620 nm. El ensayo tiene un rango de curva estándar de 0,156-20 ng/mL y un límite de detección de 0,02 µg/mL para plasma, 0,003 µg/mL para LCR y 0,002 µg/mL para el homogenado cerebral. Los resultados por debajo de esta concentración se reportaron como menos de lo reportable (LTR).

Los resultados del análisis farmacocinético se muestran en la figura 19A (plasma) y 19B (LCR) y en las tablas 23 y 24. Los animales que se sospechaba que eran positivos para el anticuerpo antiterapéutico (ATA+) fueron excluidos del análisis. Estos datos muestran que la introducción de las mutaciones YTE en la región Fc de hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 desaceleró las velocidades de depuración periférica y del LCR del anticuerpo en aproximadamente dos veces.

Tabla 23: Depuración plasmática media (± SD) y estimaciones de C_{máx} luego de una única dosis de bolo IV

Anticuerpo	Depuración plasmática(mL/día/kg)	C _{máx} (µg/mL)
hlgG4 anti-gD	1,67 ± 0,415	1950 ± 174
hlgG4.S228P.hu37D3.v28.A4	2,09 ± 0,229	1970 ± 144
hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4	1,12 ± 0,233	1850 ± 156

Tabla 24: Estimaciones de C_{máx} media (± SD) en LCR luego de única dosis de bolo IV

Anticuerpo	C _{máx} (µg/mL)
hlgG4 anti-gD	1,39 ± 0,751
hlgG4.S228P.hu37D3.v28.A4	0,910 ± 0,552
hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4	2,51 ± 1,93

Se determinó la concentración en el cerebro de los anticuerpos a los 2 y 10 días posinyección de la siguiente manera.

- 5 Se pesó el tejido cerebral y luego se homogenizó en NP-40 al 1 % en solución salina amortiguada con fosfato que contenía tabletas de cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA, cOmplete™, Mini. Luego se rotaron las muestras cerebrales homogenizadas a 4 °C durante 1 hora antes del centrifugado a 14000 rpm durante 20 minutos. Se aisló el sobrenadante para la medición del anticuerpo en cerebro mediante ELISA, según lo descrito anteriormente. En las figuras 21A-21D se muestran los resultados de ese experimento. La concentración de anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en el cerebro y la relación de concentración en cerebro:plasma para el anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 tuvieron una tendencia a ser más altas que las del anticuerpo hlgG4.S228P.hu37D3.v28.A4.

- 15 También se determinó la respuesta farmacodinámica en plasma. Se determinó la concentración de Tau total en plasma K₂EDTA, empleando un inmunoensayo de electroquimiluminiscencia (ECL, por sus siglas en inglés) (Roche Professional Diagnostics (RPD), Penzberg, Alemania). Se valida el inmunoensayo Elecsys® para la cuantificación de Tau total en LCR humano y, debido a la similitud entre Tau de mono cynomolgus y humana, se consideró aceptable para la medición de Tau de mono cynomolgus en LCR y en plasma. El ensayo captura y detecta los aminoácidos 159-224 de Tau humana y de mono cynomolgus, una región presente en todas las isoformas conocidas, independientemente del estado de fosforilación. El límite de detección más bajo (LDL, por sus siglas en inglés) del ensayo es de 1,01 pg/mL. El ensayo tolera 15,0 mg/mL de hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4.

- 25 Los resultados del análisis farmacodinámico se muestran en la figura 20. Había 3 animales por grupo después de la exclusión de los animales que se sospechaba que eran ATA+ y de otro animal que carecía de valores de referencia. Sorprendentemente, dentro del primer día de dosificación, los niveles de Tau en plasma aumentaron a un grado mayor en los animales tratados con la variante YTE en comparación con la variante distinta a YTE. Adicionalmente, ese resultado no se prevé a partir de la respuesta farmacocinética (figura 20), ya que la PK es similar entre las variantes en los primeros momentos. Se mantiene una respuesta más fuerte en los animales tratados con la variante YTE en toda la duración del muestreo.

- 30 Ejemplo 13: Farmacocinética y farmacodinámica de hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4 en el cerebro del mono cynomolgus

- 35 Para evaluar la farmacocinética del anticuerpo en el cerebro, doce monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) conscientes por grupo recibieron una sola inyección de bolo IV de hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4 a una dosis de 50 mg/kg. Se utilizó hlgG4 anti-gD como control, también a una dosis de 50 mg/kg. En diversos momentos hasta 42 días luego de la dosis, se extrajeron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpo anti-tau. Adicionalmente, en diversos momentos hasta 42 días, se sacrificaron 2 monos y se determinaron las concentraciones de anticuerpo en cerebro y en LCR.

- 40 Se determinaron las concentraciones del anticuerpo sustancialmente según lo descrito en el ejemplo 12.

- 45 La figura 22A-22B muestra la concentración de anticuerpo en el cerebro del mono cynomolgus en diversos momentos luego de la dosis, graficada en escala logarítmica (Fig.22A) y lineal (Fig.22B). La tabla 25 muestra los parámetros de las concentraciones cerebrales.

Tabla 25: Estimaciones de los parámetros PK en cerebro medios (± SD) luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{todos} (día*µg/ml)
hlgG4 anti-gD	0,175±0,02	4,26±0,35
hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4	0,12,±0,03	3,88±0,89

El anticuerpo hlgG4-S228P.YTE.hu37D3.v28.A4 mostró un aumento de la concentración en cerebro en el momento terminal, en comparación con anti-gD.

- 50 Se determinó también la concentración de los anticuerpos en diversas regiones del cerebro, incluidos el hipocampo, el cerebelo y la corteza frontal. La figura 23A-23C y las tablas 26 a 28 muestran los resultados de ese análisis.

Tabla 26: Estimaciones medias de los parámetros PK en el hipocampo luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{todos} (día*µg/ml)
hlgG4 antigD	0,159	3,95
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,087	2,87

Tabla 27: Estimaciones medias de los parámetros PK en el cerebelo luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{todos} (día*µg/ml)
hlgG4 antigD	0,196	4,30
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,139	4,56

5 Tabla 28: Estimaciones medias de los parámetros PK en la corteza frontal luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{todos} (día*µg/ml)
	0,17	4,65
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,138	4,22

Los resultados de ese experimento muestran la exposición de diversas regiones del cerebro al anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 luego de una sola inyección IV. Las exposiciones totales en el cerebro fueron comparables a través de los dos grupos y, sin embargo, de forma similar a las observaciones en plasma, hubo un aumento de aproximadamente el doble en las concentraciones de anticuerpo en el cerebro en el momento terminal en animales con administración de anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, en comparación con antigD. Ver la figura 23A-23E. Estos resultados sugieren el mantenimiento de concentraciones superiores mínimas (terminal) en el cerebro luego de la administración del anticuerpo YTE.

15 También se determinó la concentración de los anticuerpos en el LCR y en plasma con el transcurso del tiempo. Las figuras 23D (LCR) y 23E (plasma) y las tablas 29 y 30 muestran los resultados de ese análisis.

Tabla 29: Estimaciones medias de los parámetros PK en el LCR luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	AUC _{todos} (día*µg/ml)
hlgG4 anti-gD	1,270	18,400
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	3,980	21,100

20 Tabla 30: Estimaciones medias de los parámetros PK en plasma luego de una sola dosis de bolo IV

Grupo	C _{máx} (µg/ml)	T _{máx} día	AUC _{todos} (día*µg/ml)	Terminal (día 43) µg/mL
hlgG4 anti-gD	0,175±0,02	2	4,26±0,35	36,3±14,1
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,12±0,03	3	3,88±0,89	89,4±42,3

Nuevamente, de manera similar a la farmacocinética en plasma y en el cerebro, hubo un aumento de aproximadamente el doble en la concentración de anticuerpo en el LCR y en plasma en el momento terminal en animales que recibieron anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, en comparación con antigD. Ver la figura 23A-23E.

25 Utilizando las muestras de plasma extraídas de los monos cynomolgus, se evaluaron las farmacodinámicas en plasma del anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 y anticuerpo de control, luego de una única dosis IV de 50 mg/kg. Se cuantificó la Tau en plasma empleando el inmunoensayo Elecsys® descrito en el ejemplo 12.

30 Los resultados del análisis farmacodinámico se muestran en la figura 24A-24B. La figura 24A muestra la concentración media de Tau en plasma total, normalizada según el valor de referencia. La figura 24B muestra la concentración total de Tau en plasma en monos individuales en el estudio, normalizada según el valor de referencia. De manera similar a los resultados observados en el ejemplo 12, la administración de anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 dio como resultado un aumento significativo en los niveles de Tau en plasma. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría particular, estos datos sugieren que hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 se une a Tau en el cerebro y, por consiguiente, que la Tau es depurada del cerebro hacia la periferia. Estos resultados son coherentes con el contacto objetivo en el cerebro de hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4.

40 Ejemplo 14: Maduración por afinidad del anticuerpo hu37D3.v28.A4

Se realizó maduración por afinidad de hu37D3.v28.A4 mediante secuenciación profunda de una genoteca de mutagénesis de barrido. Se diseñaron dos genotecas, una para cada cadena de anticuerpo, en las cuales se asignaron de forma aleatoria las posiciones seleccionadas en regiones variables de cadena pesada o ligera con un codón NNK (código IUPAC), que codifica cualquier aminoácido o un codón de detención ámbar. El diseño permite solo un cambio de aminoácido en las regiones variables de anticuerpos por clon. Se seleccionaron las posiciones a partir de CDR y las posiciones estructurales en contacto directo o cercanas a las CDR. Las posiciones Kabat de cadena ligera 1 a 5, 24 a 27, 29 a 36, 38, 43, 44, 46 a 58, 60, 63 a 71, 87 y 89 a 97 y las posiciones Kabat de cadena pesada 1, 2, 4, 24 a 39, 43, 45 a 81, 82a, 82b, 83, 85, 86, 91 y 93 a 103 se separaron de forma aleatoria con codones NNK. Los clones de cadena ligera que no se asignaron de forma aleatoria en la posición 28 tenían una Ser en la posición 28 en lugar de la Asn de tipo salvaje. Se usaron dos fragmentos de ADN diferentes para la asignación aleatoria en la posición 28 de la cadena ligera. Un clon tenía un codón VNK y el otro un codón NYK, lo que permitía cualquier aminoácido, salvo Tyr, Cys, Trp y codones de detención. Las genotecas fueron creadas mediante síntesis de ADN (GeneWiz), produciendo 60 fragmentos de ADN lineal independientes para la cadena ligera y 75 para la cadena pesada, con una posición en cada fragmento asignada de forma aleatoria al codón NNK o la mezcla VNK/NYK. Los fragmentos de ADN lineales se agruparon para cada cadena y se clonaron en un vector de expresión en fagos de fragmento Fab monovalente (ver Lee CV et ál., *J. Immunol. Methods* 284:119-132 (2004)). Los clones de la genoteca de cadena pesada tuvieron una región variable de cadena pesada, mientras que los clones de la genoteca de cadena ligera tuvieron una región variable de cadena ligera con una mutación N28S. Se sometieron a electroporación los productos de ligación en *Escherichia coli* XL-1, se superinfectaron con el fago auxiliar M13 KO7 (New England Biolabs) y se cultivaron como se describió (ver Koenig P et ál., *J. Biol. Chem.* 290:21773-21786 (2015)).

Se realizaron tres rondas de clasificación en secuencia, utilizando la proteína del monómero de Tau adsorbida en una placa ELISA (ronda 1) o una solución de un péptido biotinilado en el extremo N que abarcaba los residuos 2 a 24 (biotina-PEG-AEPRQEFVMDHAGTYGLGDRK, SEC ID NO: 624) de Tau humana (rondas 2 y 3). En la primera ronda, se incubaron los fagos (1 OD₂₆₈/ml) con una placa de ELISA recubierta con Tau durante 2 horas a temperatura ambiente. En la segunda y la tercera ronda, los fagos (5 OD₂₆₈/ml) fueron incubados con péptido Tau biotinilado 100 nM durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se diluyeron 5 veces y se capturaron en placas de ELISA recubiertas con neutravidina (Pierce) durante 10 minutos. En la ronda 3 se aumentó la rigurosidad incubando los pocillos con fagos capturados con amortiguador de unión (PBS, albúmina de suero bovino al 0,5 %) durante otros 20 minutos, luego de la captura y el lavado de los fagos. Luego se repitió la etapa de lavado. Los fagos se eluyeron de las placas de ELISA mediante incubación con ácido clorhídrico 0,1 M y se propagaron mediante infección de *Escherichia coli*, seguida por superinfección con fago auxiliar M13KO7 (New England Biolabs). Para facilitar el análisis mediante secuenciación de última generación, en la ronda 3 se realizó una selección «falsa» en paralelo con la selección recién descrita. La selección «falsa», que pretendía proporcionar un control negativo o una muestra de referencia, se realizó usando el mismo método que la ronda 3 recién descrita, pero omitiendo la adición del péptido biotinilado.

Los resultados iniciales fueron obtenidos mediante secuenciación Sanger de colonias individuales.

Además, se extrajo ADN plásmido de las poblaciones XL-1 de *Escherichia coli* utilizadas para la amplificación de fagos. Se amplificaron insertos mediante amplificación de PCR de 18 ciclos usando ADN polimerasa Phusion (New England Biolabs), seguida por purificación en gel de agarosa de los amplicones. Los amplicones se secuenciaron mediante secuenciación Illumina, como se describió previamente (Koenig P., et ál. (2015). *J. Biol. Chem.* 290, 21773-21786). Las secuencias se filtraron usando las secuencias de cebador de PCR y retirando las secuencias más largas o más cortas que la secuencia original o las que contenían más de una mutación de codificación en la región variable. Se calcularon relaciones de enriquecimiento dividiendo la frecuencia de una mutación específica en una posición dada en una población entre la frecuencia de la misma mutación en una segunda población. Las poblaciones fueron nombradas utilizando las siguientes abreviaturas:

- R0 - genoteca no clasificada
- R2 - fagos de la selección de la ronda 2 con péptido biotinilado 100 nM
- R3 - fagos de la selección de la ronda 3 con péptido biotinilado 100 nM
- R3M - fagos de la selección «falsa» de la ronda 3.

Las mutaciones seleccionadas se transfectaron, de forma individual o en combinación, en los dominios variables de hu37D3.v28.A4, se sintetizaron y clonaron en un vector de expresión de células de mamífero de IgG. En algunos casos, se transfirieron mutaciones seleccionadas a dominios variables que se habían humanizado de forma diferente a hu37D3.v28.A4. Los ejemplos de anticuerpos humanizados de forma alternativa con mutaciones identificadas según los procedimientos de expresión en fagos descritos anteriormente incluyen hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 y hu37D3-H9.v93.

Los plásmidos de cadena ligera y cadena pesada fueron expresados en células Expi293 mediante transfección transitoria y la IgG fue purificada de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad con la resina MabSelect SuRe (GE Life Sciences). Se analizaron las IgG purificadas para determinar la unión al monómero de Tau humana usando resonancia de plasmones superficiales. Brevemente, se usó un instrumento Biacore T200 para capturar anticuerpos en un chip de captura de IgG humana que se había generado usando un chip sensor CM5 serie S y el kit

de captura de IgG humana (GE Life Sciences). Los anticuerpos capturados se expusieron al monómero de Tau humana en solución y se monitorearon las fases de asociación y disociación. Las afinidades se calcularon ajustando un modelo de unión 1:1 a los datos cinéticos usando software de evaluación Biacore.

- 5 En las figuras 25A-25B se muestra una comparación de las regiones variables de cadena ligera y pesada de hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 y hu37D3-H9.v93 con respecto al hu37D3-H9.v28.A4 original. El sombreado de color negro indica aminoácidos diferentes entre el anticuerpo original y los madurados por afinidad.

- 10 Los anticuerpos hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 y hu37D3-H9.v93 madurados por afinidad se evaluaron para determinar su interacción monovalente con el monómero de Tau recombinante humana y de mono cynomolgus.

- 15 La afinidad con respecto a Tau humana y de mono cynomolgus se midió a 37 °C usando un instrumento T200 Biacore, el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un chip sensor CM5 serie S. Los anticuerpos se diluyeron hasta 1 µg/ml en amortiguador de procesamiento HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05 %) y se capturaron a una velocidad de flujo de 10 µg/ml durante 15 segundos. Los datos se recopilaban para la unión del monómero de Tau humana y de cynomolgus, cada uno inyectado a 0, 0,1, 0,4, 1,2, 3,7, 11,1 y 33,3 nM, usando una velocidad de flujo de 30 µl/min, un tiempo de contacto de 300 s y un tiempo de disociación de 900 s. Entre ciclos, la superficie se regeneró con cloruro de magnesio 3 M. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el software BIAEvaluation.

- 20 La figura 26A presenta datos de afinidad para el anticuerpo hu37D3-H9.v76 para el monómero de Tau humana y cada curva representa una concentración de anticuerpo diferente. La figura 26B presenta estos datos para el monómero de Tau de mono cynomolgus (cyno). Cada uno de los anticuerpos hu37D3-H9.v76, hu37D3-H9.v83 y hu37D3-H9.v93 madurados por afinidad tuvo una K_D de 0,1 nM a 37 °C con respecto a los monómeros de Tau humana y de mono cynomolgus, como se muestra en la tabla 31. En experimentos paralelos, el anticuerpo hu37D3-H9.v28.A4 original tuvo una K_D de 5-8 nM (no se muestra datos).

Tabla 31: Medición de afinidad de anticuerpos madurados por afinidad hu37D3

	Monómero de Tau humana			Monómero de Tau de cyno		
	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
hu37D3-H9.v76	0,1	6,94 X10 ⁶	8,92 X10 ⁻⁴	0,1	9,27 X10 ⁶	1,14 X10 ⁻³
hu37D3-H9.v83	0,1	6,19 X10 ⁶	8,18 X10 ⁻⁴	0,1	9,55 X10 ⁶	1,14 X10 ⁻³
hu37D3-H9.v93	0,1	6,89 X10 ⁶	1,02 X10 ⁻³	0,1	1,29 X10 ⁷	1,78 X10 ⁻³

- 30 Si bien la invención que antecede ha sido descrita con ciertos detalles a modo de ilustración y ejemplo con el objetivo de comprenderla mejor, las descripciones y los ejemplos no deberían interpretarse como una limitación del alcance de la invención. Las descripciones de toda patente y bibliografía científica mencionadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad mediante referencia.

- 35

Tabla de Secuencias

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
2	Epítipo de Tau humana(2-24)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRK
4	Epítipo de Tau de mono cynomolgus(2-24)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRK
10	región variable de cadena pesada (VH) de 37D3-H9	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYYTY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
11	región variable de cadena ligera (VL) de 37D3-H9	DDLLTQTPLS LPVSLGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLVP WTFGGGKLE IK
12	37D3-H9 HVR-H1	SYGMS
13	37D3-H9 HVR-H2	TINSGGTYYTY PDSVKG
14	37D3-H9 HVR-H3	SYSGAMDY
15	37D3-H9 HVR-L1	RSSQSIVHSNNGNTYFE
16	37D3-H9 HVR-L2	KVSNRFS
17	37D3-H9 HVR-L3	FQGS LVPWT

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
20	región variable de cadena pesada (VH) de 37D3–H9b	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYVCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
21	región variable de cadena ligera (VL) de 37D3–H9b	EDLLTQTPLS LPVSLGDPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLVP WTFGGGKLE IK
22	37D3–H9b HVR–H1	SYGMS
23	37D3–H9b HVR–H2	TINSGGTYTYPDSVKG
24	37D3–H9b HVR–H3	SYSGAMDY
25	37D3–H9b HVR–L1	RSSQSIVHSNNGNTYFE
26	37D3–H9b HVR–L2	KVSNRFS
27	37D3–H9b HVR–L3	FQGSLVPWT
30	región variable de cadena pesada (VH) de 11E10–B8	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISGGGSYTYYPDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYCAVSY DGAMDYWGQG TSVTVSS
31	región variable de cadena ligera (VL) de 11E10–B8	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGL YYCFQGSHVP WTFGGGKLE IK
32	11E10–B8 HVR–H1	SYGMS
33	11E10–B8 HVR–H2	TISGGGSYTYYPDSVKG
34	11E10–B8 HVR–H3	SYDGAMDY
35	11E10–B8 HVR–L1	RSSQSIVHSNNGNTYLE
36	11E10–B8 HVR–L2	KVSNRFS
37	11E10–B8 HVR–L3	FQGSHVPWT
40	región variable de cadena pesada (VH) de 54C1–H11 y 61E7–C4	EVQLVESGGD LVKPGGSLKV SCVASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLDWVAT ISSGGNYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYCCASSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
41	región variable de cadena ligera (VL) de 54C1–H11 y 61E7–C4	DTVMTQSPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYTVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP WTFGGGKLE IK
42	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–H1	SYGMS
43	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–H2	TISSGGNYTYPDSVKG
44	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–H3	SYSGAMDY
45	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–L1	RSSQSIVHSNNGNTYLE
46	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–L2	TVSNRFS
47	54C1–H11 y 61E7–C4 HVR–L3	FQGSHVPWT
50	región variable de cadena pesada (VH) de 3A4–H4	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYFCATSY DGAMDYWGQG TSVTVSS
51	región variable de cadena ligera (VL) de 3A4–H4	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGTLVP WTFGGGKLE IK
52	3A4–H4 HVR–H1	SYGMS
53	3A4–H4 HVR–H2	TISSGGTYTYPDSVKG
54	3A4–H4 HVR–H3	SYDGAMDY
55	3A4–H4 HVR–L1	RSSQIVHSNNGNTYLE
56	3A4–H4 HVR–L2	KVSNRFS
57	3A4–H4 HVR–L3	FQGTLPWT
60	región variable de cadena pesada (VH) de 19H6–F7	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYCAPSY DGAMDYWGQG TSVTVSS
61	región variable de cadena ligera (VL) de 19H6–F7	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLVP WTFGGGKLE IK
62	19H6–F7 HVR–H1	SYGMS
63	19H6–F7 HVR–H2	TISSGGTYTYPDSVKG
64	19H6–F7 HVR–H3	SYDGAMDY
65	19H6–F7 HVR–L1	RSSQSIVHSNNGNTYLE
66	19H6–F7 HVR–L2	KVSNRFS

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
67	19H6-F7 HVR-L3	FQGSLVPWT
70	región variable de cadena pesada (VH) de 94B2-C1	EVQLQQSGPE LVKPGASMKI SCKASGYSLT GYTMNWWKQS HGKNLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFQKATL TVDKSSNTAY MELLSLTFED SAVYYCARQG AYWGQGTTLVT VSA
71	región variable de cadena ligera (VL) de 94B2-C1	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTTHFP WTFGGGTKLE IK
72	94B2-C1 HVR-H1	GYTMN
73	94B2-C1 HVR-H2	LISPYNGVTSYNQKFQK
74	94B2-C1 HVR-H3	QGAY
75	94B2-C1 HVR-L1	KSSQSLLDSDGKTYLN
76	94B2-C1 HVR-L2	LVSKLDS
77	94B2-C1 HVR-L3	WQGTTHFPWT
80	región variable de cadena pesada (VH) de 125B11-H3	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASRFIFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNLR EDTGIYYCTG GTTYWGQGT LTVSS
81	región variable de cadena ligera (VL) de 125B11-H3	DIVMTQSQKF LSTSVGDRVN ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GQSPGLLIYS ASIRYTGVPD RFTGNGSGTD FTLTISDMQS EDLADYFCQQ FRTPYPTFGG GTKLEIK
82	125B11-H3 HVR-H1	NYWMN
83	125B11-H3 HVR-H2	QIRLKSDNYA THYAESVKG
84	125B11-H3 HVR-H3	GTTY
85	125B11-H3 HVR-L1	KASQNVGTAVA
86	125B11-H3 HVR-L2	SASIRYT
87	125B11-H3 HVR-L3	QQFRTPYPT
90	región variable de cadena pesada (VH) de 113F5-F7	EVKLEESGGG LVQPGGSMRL SCVASEFTFS NYWMNWIRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNFS VYLQMNLR EDTGIYYCTG GTSYWGQGT LTVSS
91	región variable de cadena ligera (VL) de 113F5-F7	DIVMTQSQKI MSTSVGDRVS ITCKASQNVG TAVAWYQGRP GHSPKLLIYS ASRRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTIINVQS EDLADYFCQQ FSTYPYTFGV GTKLEIK
92	113F5-F7 HVR-H1	NYWMN
93	113F5-F7 HVR-H2	QIRLKSDNYATHYAESVKG
94	113F5-F7 HVR-H3	GTSY
95	113F5-F7 HVR-L1	KASQNVGTAVA
96	113F5-F7 HVR-L2	SASRRFS
97	113F5-F7 HVR-L3	QQFSTYPYT
100	región variable de cadena pesada (VH) de 26C1-B11	EVHLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMYWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDEY FPKFQKATM TADTSSKTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGQGTSTVS S
101	región variable de cadena ligera (VL) de 26C1-B11	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTTHFP WTFGGGTKLE IK
102	26C1-B11 HVR-H1	DYYMY
103	26C1-B11 HVR-H2	WIDPENGDE YFPKFQG
104	26C1-B11 HVR-H3	WRARATNSAL DY
105	26C1-B11 HVR-L1	KSSQSLLDSD GKTYLN
106	26C1-B11 HVR-L2	LVSKLDS
107	26C1-B11 HVR-L3	WQGTTHFPWT

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
110	región variable de cadena pesada (VH) de 26C1–C8	EVHLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMYWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDEY FPKFQGKATM TADTSSKTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGQGSTVTVS S
111	región variable de cadena ligera (VL) de 26C1–C8	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGHFP WFTGGGKLE IK
112	26C1–C8 HVR–H1	DYYMY
113	26C1–C8 HVR–H2	WIDPENGDEY FPKFQG
114	26C1–C8 HVR–H3	WRARATNSAL DY
115	26C1–C8 HVR–L1	KSSQSLLDSD GKTYLN
116	26C1–C8 HVR–L2	LVSKLDS
117	26C1–C8 HVR–L3	WQGHFPWT
120	región variable de cadena pesada (VH) de 30G1–B2	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMYWVKQT PVHGLEWIGA IDPETGDTAY NQKFKGKATL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYCIRQY GNWFPYWGQG TLTVSA
121	región variable de cadena ligera (VL) de 30G1–B2	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HANGNTYLHW FLQKPGSPK LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGG GSGTDFTLKI TRLEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGKLE IK
122	30G1–B2 HVR–H1	DYEMY
123	30G1–B2 HVR–H2	AIDPETGDTAYNQKFKG
124	30G1–B2 HVR–H3	QYGNWFPY
125	30G1–B2 HVR–L1	RSSQSLVHANGNTYLH
126	30G1–B2 HVR–L2	KVSNRFS
127	30G1–B2 HVR–L3	SQSTHVPFT
130	región variable de cadena pesada (VH) de 66F5–A1	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFI DYEMNWKQT PVHGLEWIGA IDPENGGTAY NQKFKGKAIV TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCSGPH FDYWGQGTTL TVSS
131	región variable de cadena ligera (VL) de 66F5–A1	DIVMTQSPSS LAMSVGQKVT MSCSSQSLL NSSTQKNYLA WYQQKPGQSP KLLVYFASTR ESGVPDRFIG GSGTDFTLT ISSVQAEDLA DYFCQQHYST PYTFGGGKLE IK
132	66F5–A1 HVR–H1	DYEMN
133	66F5–A1 HVR–H2	AIDPENGGTAYNQKFKG
134	66F5–A1 HVR–H3	PHFDY
135	66F5–A1 HVR–L1	KSSQSLLNSS TQKNYLA
136	66F5–A1 HVR–L2	FASTRES
137	66F5–A1 HVR–L3	QQHYSTPYT
140	región variable de cadena pesada (VH) de 123E9–A1	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYMKWVKQS HGKSLEWIGD IDPNNGGTSY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MQLNSLTSED SAVYYCARSA GFGDSFSFWG LGTLTVSA
141	región variable de cadena ligera (VL) de 123E9–A1	DVLMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGF YYCFQGSHVP PTFGGGKLE IK
142	123E9–A1 HVR–H1	DYYMK
143	123E9–A1 HVR–H2	DIDPNNGGTSYNQKFKG
144	123E9–A1 HVR–H3	SAGFGDSFSF
145	123E9–A1 HVR–L1	RSSQSIVHSNNGNTYLE
146	123E9–A1 HVR–L2	KVSNRFS
147	123E9–A1 HVR–L3	FQGSHVPPT

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
150	región variable de cadena pesada (VH) de 15C6–A7	EVQLQQSGPE LVKPGASVMM TCKASGYTFT DYMKWVKQS NGKSLEWIGD LDPYTGANY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MHLNSLTSED SAVYYCARSR GYGDSFAYWG QGTLVTVSA
151	región variable de cadena ligera (VL) de 15C6–A7	DVLTMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFGVDPDKFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQGSHVP PTFGGGTKLE IK
152	15C6–A7 HVR–H1	DYMK
153	15C6–A7 HVR–H2	DLDPYTGANY YNQKFKG
154	15C6–A7 HVR–H3	SRGYGDSFAY
155	15C6–A7 HVR–L1	RSSQNIVHSN GNTYLE
156	15C6–A7 HVR–L2	KVSNRFS
157	15C6–A7 HVR–L3	FQGSHVPPT
160	región variable de cadena pesada (VH) de 19F8–B1	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYMKWVKQS HGKSLEWIGD LNPNGGTLY NQKFKGQATL TVDKSSSTAY MQFNSLTSED SAVYYCARSA GYGDSFAYWG QGTLVTVSA
161	región variable de cadena ligera (VL) de 19F8–B1	DVLTMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFGVDPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YFCFQGSHVP PTFGGGTKLE IK
162	19F8–B1 HVR–H1	DYMK
163	19F8–B1 HVR–H2	DLNPNGGTLY YNQKFKG
164	19F8–B1 HVR–H3	SAGYGDSFAY
165	19F8–B1 HVR–L1	RSSQNIVHSN GNTYLE
166	19F8–B1 HVR–L2	KVSNRFS
167	19F8–B1 HVR–L3	FQGSHVPPT
170	región variable de cadena pesada (VH) de 24A11–D5	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYMKWVKQS HGKSLEWIGD LNPKNGGIY NQKFKGQATL TVDKSSSTAY MQLNSLTSED SAVFYCARSG GYGDSFAYWG QGTLVTVSA
171	región variable de cadena ligera (VL) de 24A11–D5	DVLTMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFGVDPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YFCFQGSHVP PTFGGGTKLE IK
172	24A11–D5 HVR–H1	DYMK
173	24A11–D5 HVR–H2	DLNPKNGGIY YNQKFKG
174	24A11–D5 HVR–H3	SGGYGDSFAY
175	24A11–D5 HVR–L1	RSSQNIVHSN GNTYLE
176	24A11–D5 HVR–L2	KVSNRFS
177	24A11–D5 HVR–L3	FQGSHVPPT
180	región variable de cadena pesada (VH) de 126F11–G11	EVQLQQSGAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK DDYMHVWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDEY ASKFQKGKATI TTDTSSTAY LQLSSLTSED TAVYYCLDFA YGYWGQGTTL TVSS
181	región variable de cadena ligera (VL) de 126F11–G11	DVLTMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFGVDPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP PAFGGGTKLE IK
182	126F11–G11 HVR–H1	DDYMH
183	126F11–G11 HVR–H2	WIDPENGDEY ASKFQG
184	126F11–G11 HVR–H3	FAYGY
185	126F11–G11 HVR–L1	RSSQSIVHSN GNTYLE
186	126F11–G11 HVR–L2	KVSNRFS
187	126F11–G11 HVR–L3	FQGSHVPPA
190	región variable de cadena pesada (VH) de 89F4–A1	EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKLEWVAR IRKSNYYAA YFADSVKDRF TISRDDSQT LYLQMNNLKS EDTAMYYCVS GGNYPFAYW GQGLVTVSA
191	región variable de cadena ligera (VL) de 89F4–A1	NIMMTQSPSS LAVSAGEKVT MSCSSQSVF YSSEQRNYLA WYQKPGQSP KLLISWASTR ESGVPDRFTG GSGTDFTLT ISSVQGEDLA VYYCHQYLSS FTFGSGTKLE IK

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
192	89F4-A1 HVR-H1	TYAMN
193	89F4-A1 HVR-H2	RIRSKSNYYA AYFADSVKD
194	89F4-A1 HVR-H3	GGNYVPFAY
195	89F4-A1 HVR-L1	KSSQSVFYSS EQRNYLA
196	89F4-A1 HVR-L2	WASTRES
197	89F4-A1 HVR-L3	HQYLSSFT
200	región variable de cadena pesada (VH) de 93A8-D2	EVQLQQSGPV LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYVNWVKQS HGKGLEWIGL INPNNGRTSY NQNFNDKATL TVDKSSSTAF MDLNSLTSED SAVYYCTREG GTGYWGQGT LSVSS
201	región variable de cadena ligera (VL) de 93A8-D2	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPQGSPR RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGDFTLKI SRVAAEDLGV YYCWQGTHFP RTFGGGTKLE IK
202	93A8-D2 HVR-H1	DYYVN
203	93A8-D2 HVR-H2	LINPNNGRTSYNQNFND
204	93A8-D2 HVR-H3	EGGTGY
205	93A8-D2 HVR-L1	KSSQSLLDSDGKTYLN
206	93A8-D2 HVR-L2	LVSKLDS
207	93A8-D2 HVR-L3	WQGTHFPRT
210	región variable de cadena pesada (VH) de 14F5-D9	EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCATSGFTFS DFYMEWVRQS PGKRLEWIAA SKNKANDYTT EYNASVKDRF FVSRDTSQSI LYLQMNALRA EDTAIYYCAR DALGTVFAYW GQGLTVTVSA
211	región variable de cadena ligera (VL) de 14F5-D9	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGTYLHW YLQKPGQSPK LLIYKVFNRFG SGVPDRFSGS GSGDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTLVP LTFGAGTKLE LK
212	14F5-D9 HVR-H1	DFYME
213	14F5-D9 HVR-H2	ASKNKANDYT TEYNASVKD
214	14F5-D9 HVR-H3	DALGTVFAY
215	14F5-D9 HVR-L1	RSSQSLVHSN GNTYLH
216	14F5-D9 HVR-L2	KVFNRFS
217	14F5-D9 HVR-L3	SQSTLVPLT
220	región variable de cadena pesada (VH) de 73H6-B8	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTISGFSLT SYGVHWVRQP PGKLEWLVV IWSDGSTTYN SALKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTTDDT AMYYCARQGG FITTAYYAMD YWGQTSVTV SS
221	región variable de cadena ligera (VL) de 73H6-B8	DIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MCKSSQSLL NSRTRKNYLA WYQQKPGQSP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG GSGDFTLT ISSVQAEDLA VYYCKQSYNL YTFGGGKLE IK
222	73H6-B8 HVR-H1	SYGVH
223	73H6-B8 HVR-H2	VIWSDGSTTY NSALKS
224	73H6-B8 HVR-H3	QGGFITTAAY AMDY
225	73H6-B8 HVR-L1	KSSQSLLNSR TRKNYLA
226	73H6-B8 HVR-L2	WASTRES
227	73H6-B8 HVR-L3	KQSYNLYT
230	región variable de cadena pesada (VH) de 22G7-C9	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DCSIHWWKQA PGEGLKWMGW INTETGEPSY ADDFKGRFAF SLETSASTAF LQINNLSKSED TASYFCGTAY YRYDGALDYW GQGTSVTVSS
231	región variable de cadena ligera (VL) de 22G7-C9	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASQSVS TSSYSYMHWF QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWELPW TFGGGTKLEI K
232	22G7-C9 HVR-H1	DCSIH
233	22G7-C9 HVR-H2	WINTETGEPS YADDFKG
234	22G7-C9 HVR-H3	AYRYRDGALD Y
235	22G7-C9 HVR-L1	RASQSVSTSS YSYMH
236	22G7-C9 HVR-L2	YASNLES
237	22G7-C9 HVR-L3	QHSWELPWT
240	región variable de cadena pesada (VH) de 7A11-C12	QIQLVQSGPD LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWWKQA PGKGLKWMGW INTNTGEPTY AEEFKGRFAF SLETSASTAY LQIDNLKNEED TATYFCARGT VSFYWGQGT LVTVSA
241	región variable de cadena ligera (VL) de 7A11-C12	DVVMSTPLS LPVSLGDHAS ISCRSSQNLV HSDGNTYLHW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFG SGVPDRFSGS GSGDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVI FTFGSGTKLE IK
242	7A11-C12 HVR-H1	NYGMN

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
243	7A11-C12 HVR-H2	WINTNTGEPT YAEFFKG
244	7A11-C12 HVR-H3	GTVSFPY
245	7A11-C12 HVR-L1	RSSQNLVHSD GNTYLH
246	7A11-C12 HVR-L2	KVSNRFS
247	7A11-C12 HVR-L3	SQSTHVIFT
250	región variable de cadena pesada (VH) de 12A10-E8	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWWKQA PGKGLKWMGW INMYTGEPTY GDDFKGRFVF SLETSVSTVY LQINNLKKED TATFFCARGG RPDYWGQGTG VTVSS
251	región variable de cadena ligera (VL) de 12A10-E8	DVLTMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVFNRFG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI NRVEAEDLGV YYCLQGSHVP YTFGGGTGLE IK
252	12A10-E8 HVR-H1	NYGMN
253	12A10-E8 HVR-H2	WINMYTGEPT YGDDFKG
254	12A10-E8 HVR-H3	GGRPDY
255	12A10-E8 HVR-L1	RSSQSIVHSN GNTYLE
256	1 2A10-E8 HVR-L2	KVFNRF
257	12A10-E8 HVR-L3	LQGSHPY
260	región variable de cadena pesada (VH) de 55E7-F11	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCAG YFYGGYFDVW GTGTTVTSS
261	región variable de cadena ligera (VL) de 55E7-F11	ELVLTQSPTT MAASPGKIT ITCSSSSIS SNYLHWYQQK PGFSPKLLIY RTSNLAGSVP ARFSGSGSGT SYSLTIGTME AEDVATYYCQ QGSSLPFTFG SGTGLEIK
262	55E7-F11 HVR-H1	NYWMN
263	55E7-F11 HVR-H2	QIRLKSDNYA THYAESVKG
264	55E7-F11 HVR-H3	YFYGGYFDV
265	55E7-F11 HVR-L1	SASSSISSNY LH
266	55E7-F11 HVR-L2	RTSNLAS
267	55E7-F11 HVR-L3	QQGSSLPFT
270	región variable de cadena pesada (VH) de 52F6-F11	QVQLQQSGTE LAKPGASVKL SCKASGYTFT HYWMHWIKQR PGQGLEWIGY IYPTNDYTKY NQNFDRKATL TADESSNSAY MLNSLTIED SAVYYCARAG NRVFDFWQGG TLTIVSS
271	región variable de cadena ligera (VL) de 52F6-F11	QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSTGAVT TSNFANWVQE KPDHLFTGLI GGTNNRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF GGGTKLTVL
272	52F6-F11 HVR-H1	HYWMH
273	52F6-F11 HVR-H2	YIYPTNDYTK YNQNFDR
274	52F6-F11 HVR-H3	AGNRVDFD
275	52F6-F11 HVR-L1	RSSTGAVTTS NFAN
276	52F6-F11 HVR-L2	GTNNRAP
277	52F6-F11 HVR-L3	ALWYSNLWV
280	región variable de cadena pesada (VH) de Hu37D3-H9.v1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTIVSS
281	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v1	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFG SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSGLVPTWTFGGGTGLE IK
282	Hu37D3-H9.v1 HVR-H1	SYGMS
283	Hu37D3-H9.v1 HVR-H2	TINSGGTYTYPDSVKG
284	Hu37D3-H9.v1 HVR-H3	SYSGAMDY
285	Hu37D3-H9.v1 HVR-L1	RSSQSIVHSNNGNTYFE
286	Hu37D3-H9.v1 HVR-L2	KVSNRFS
287	Hu37D3-H9.v1 HVR-L3	FQGSGLVPWT

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
288	cadena pesada de Hu37D3-H9.v1 IgG1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHHKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTCPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK
289	cadena ligera de Hu37D3-H9.v1 IgG1	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNTF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGS LVP WFTGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRKAK VQWVKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
290	región variable de cadena pesada (VH) de Hu37D3-H9.v5	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
291	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v5	EDVLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGTYFEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNTF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGS LVP WFTGQGTKVE IK
292	Hu37D3-H9.v5 HVR-H1	SYGMS
293	Hu37D3-H9.v5 HVR-H2	TINSGGTYTYPDSVKG
294	Hu37D3-H9.v5 HVR-H3	SYSGAMDY
295	Hu37D3-H9.v5 HVR-L1	RSSQSIVHSNNGTYFE
296	Hu37D3-H9.v5 HVR-L2	KVSNRFS
297	Hu37D3-H9.v5 HVR-L3	FQGS LVPWT
300	región variable de cadena pesada (VH) de Hu94B2.v105	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDKSTSTAY LELSSLRSSE TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
301	región variable de cadena ligera (VL) de Hu94B2.v105	DIVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGT HFP WFTGQGTKVE IK
302	Hu94B2.v105 HVR-H1	GYTMN
303	Hu94B2.v105 HVR-H2	LISPYNGVTSYNQKFKG
304	Hu94B2.v105 HVR-H3	QGAY
305	Hu94B2.v105 HVR-L1	KSSQSLLDSDGKTYLN
306	Hu94B2.v105 HVR-L2	LVSKLDS
307	Hu94B2.v105 HVR-L3	WQGT HFPWT
310	región variable de cadena pesada (VH) de hu125B11.v17	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT LVT VSS
311	región variable de cadena ligera (VH) de hu125B11.v17	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVPs RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTPYPTFGQ GTKVEIK
312	hu125B11.v17 HVR-H1	NYWMN
313	hu125B11.v17 HVR-H2	QIRLKSDNYATHYAESVKG
314	hu125B11.v17 HVR-H3	GT TY
315	hu125B11.v17 HVR-L1	KASQNVGTAVA
316	hu125B11.v17 HVR-L2	SASIRYT
317	hu125B11.v17 HVR-L3	QQFRTPYT
320	región variable de cadena pesada de (VH) hu125B11.v26	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT LVT VSS
321	región variable de cadena ligera (VH) de hu125B11.v26	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVPs RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTPYPTFGQ GTKVEIK
322	hu125B11.v26 HVR-H1	NYWMN
323	hu125B11.v26 HVR-H2	QIRLKSDNYATHYAESVKG

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
324	hu125B11.v26 HVR-H3	GTTY
325	hu125B11.v26 HVR-L1	KASQNVGTAVA
326	hu125B11.v26 HVR-L2	SASIRYT
327	hu125B11.v26 HVR-L3	QQFRTPYT
330	región variable de cadena pesada (VH) de hu125B11.v28	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT LTVSS
331	región variable de cadena ligera (VL) de hu125B11.v28	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAWAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP SRFSGSGSGTD FTLTISLQ EDFATYYCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
332	hu125B11.v28 HVR-H1	NYWMN
333	hu125B11.v28 HVR-H2	QIRLKSDNYATHYAESVKG
334	hu125B11.v28 HVR-H3	GTTY
335	hu125B11.v28 HVR-L1	KASQNVGTAVA
336	hu125B11.v28 HVR-L2	SASIRYT
337	hu125B11.v28 HVR-L3	QQFRTPYT
340	región variable de cadena pesada (VH) de Hu37D3-H9.v28.A4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
341	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v28.A4	DDVLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
342	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-H1	SYGMS
343	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-H2	TINSGGTYTYPDSVKG
344	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-H3	SYSGAMDY
345	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-L1	RSSQSIVHSNNGNTYLE
346	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-L2	KVSNRFS
347	Hu37D3-H9.v28.A4 HVR-L3	FQGSLVPWT
348	cadena pesada de Hu37D3-H9.v28.A4 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
602	cadena pesada des-K de Hu37D3-H9.v28.A4 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLG
349	cadena ligera de Hu37D3-H9.v28.A4 IgG4-S228P.YTE	DDVLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYS SSSLTSLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
442	hu125B11-H3.LC1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAWAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVP SRFSGSGSGTD FTLTISLQ EDFATYFCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
443	hu125B11-H3.LC2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP S RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
444	hu125B11-H3.LC3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVP S RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
445	hu125B11-H3.LC4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP S RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
446	hu125B11-H3.HC1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
447	hu125B11-H3.HC2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
448	hu125B11-H3.HC3	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
449	hu125B11-H3.HC4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
450	hu125B11-H3.HC5	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
451	hu125B11-H3.HC6	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYFMNWRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGT L VTVSS
452	Hu94B2.HC1	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
453	Hu94B2.HC2	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
454	Hu94B2.HC3	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATI TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
455	Hu94B2.HC4	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
456	Hu94B2.HC5	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
457	Hu94B2.HC6	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
458	Hu94B2.HC7	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TRDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
459	Hu94B2.HC8	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TVDTSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
460	Hu94B2.LC9	DVVMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
461	Hu94B2.LC10	DVVMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
462	Hu94B2.LC11	DVVMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
463	Hu94B2.LC12	DVVMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
464	Hu94B2.LC13	DIVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
465	Hu94B2.LC14	DIVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
466	Hu94B2.LC15	DIVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
467	Hu94B2.LC16	DIVMTQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
468	Hu37D3-H9.v5,1 HVR-L1	RSSQSIVHSNANTYFE
469	Hu37D3-H9.v5,2 HVR-L1	RSSQSIVHSSGNTYFE
470	Hu37D3-H9.v5,3 HVR-L1	RSSQSIVHSDGNTYFE
471	Hu37D3-H9.v5,4 HVR-L1	RSSQSIVHSQGNTYFE
472	Hu37D3-H9.v5,5 HVR-L1	RSSQSIVHSEGNTYFE
473	Hu37D3-H9.v5,6 HVR-L1	RSSQSIVHSAGNTYFE
474	Hu37D3-H9.v5,7 HVR-L1	RSSQSIVHSNGDTYFE
475	Hu37D3-H9.v5,8 HVR-L1	RSSQSIVHSNGQTYFE
476	Hu37D3-H9.v5,9 HVR-L1	RSSQSIVHSNGETYFE
477	Hu37D3-H9.v5,10 HVR-L1	RSSQSIVHSNGATYFE
478	Hu37D3-H9.v5,11 HVR-L1	RSSQSIVHSNGSTYFE
479	Hu37D3.v28 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
480	Hu37D3.v28.A2 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
481	Hu37D3.v28.A4 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
482	Hu37D3.v28.A6 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
483	Hu37D3.v28.A8 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
484	Hu37D3.v28.A10 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
485	Hu37D3.v28.A12 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
486	Hu37D3.v28.A14 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
487	Hu37D3.v28.A16 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
488	Hu37D3.v28.A18 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
489	Hu37D3.v28.A20 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
490	Hu37D3.v28.A22 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
491	Hu37D3.v28.A24 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
492	Hu37D3.v28.A26 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYFE
493	Hu37D3.v28.A28 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
494	Hu37D3.v28.A30 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
495	Hu37D3.v28.B1 HVR-L1	RSSQSIVHSIGNTFFE
496	Hu37D3.v28.B2 HVR-L1	RSSQSIVHSMGNTFFE
497	Hu37D3.v28.B3 HVR-L1	RSSQSIVHSQGNWFE
498	Hu37D3.v28.B4 HVR-L1	RSSQSIVHSQGNTHFE
499	Hu37D3.v28.B6 HVR-L1	RSSQSIVHSDGNTRFE
500	Hu37D3.v28.B7 HVR-L1	RSSQSIVHSDGNTRKFE
501	Hu37D3.v28.B8 HVR-L1	RSSQSIVHSEGNTRFE
502	Hu37D3.v28.C1 HVR-L1	RSSQSIVHSNNNTYFE
503	Hu37D3.v28.C2 HVR-L1	RSSQSIVHSNDNTYFE
504	Hu37D3.v28.D1 HVR-L1	RSSQSIVHANGNTYFE
505	Hu37D3.v28.E1 HVR-L1	RSSQSIVNSNGNTYFE
506	Hu37D3.v28.E2 HVR-L1	RSSQSIVQSNNGNTYFE
507	Hu37D3.v28.E3 HVR-L1	RSSQSIVDSGNTYFE
508	Hu37D3.v28.F1 HVR-L1	RSSQSIVHSNTNTYFE
509	Hu37D3.v28.F2 HVR-L1	RSSQSIVHTNGNTYFE
510	Hu37D3.v28.F3 HVR-L1	RSSQSIVHTNANTYFE
511	Hu37D3.v28,51 HVR-L1	RSSQSIVHSHGNTYFE
512	Hu37D3.v28,52 HVR-L1	RSSQSIVHSGKNTYFE
513	Hu37D3.v28,53 HVR-L1	RSSQSIVHSRGNTYFE
514	Hu37D3.v28,54 HVR-L1	RSSQSIVHSLGNTYFE
515	Hu37D3.v28,55 HVR-L1	RSSQSIVHSNQNTYFE
516	Hu37D3.v28,56 HVR-L1	RSSQSIVHSNYNTYFE

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
517	Hu37D3.v28,57 HVR-L1	RSSQSIVHSNFNTYFE
518	Hu37D3.v29,1 HVR-L1	RSSQSIVHSNGDTYFE
519	Hu37D3.v29,2 HVR-L1	RSSQSIVHSNGQTYFE
520	Hu37D3.v29,3 HVR-L1	RSSQSIVHSNGETYFE
521	Hu37D3.v29,4 HVR-L1	RSSQSIVHSNGATYFE
522	Hu37D3.v29,5 HVR-L1	RSSQSIVHSNGHTYFE
523	Hu37D3.v29,6 HVR-L1	RSSQSIVHSNGKTYFE
524	Hu37D3.v29,7 HVR-L1	RSSQSIVHSNGLTYFE
525	Hu37D3.v29,8 HVR-L1	RSSQSIVHSNADTYFE
526	Hu37D3.v29,9 HVR-L1	RSSQSIVHSNAQTYFE
527	Hu37D3.v29,10 HVR-L1	RSSQSIVHSNAETYFE
528	Hu37D3.v29,11 HVR-L1	RSSQSIVHSNAATYFE
529	Hu37D3.v29,12 HVR-L1	RSSQSIVHSNAHTYFE
530	Hu37D3.v29,13 HVR-L1	RSSQSIVHSNAKTYFE
531	Hu37D3.v29,14 HVR-L1	RSSQSIVHSNALTIFE
532	Hu37D3-H9.v30,1 HVR-L1	RSSQSIVHSGGNTYFE
533	Hu37D3-H9.v30,2 HVR-L1	RSSQSIVHSTGNTYFE
534	Hu37D3-H9.v30,3 HVR-L1	RSSQSIVHSVGNTYFE
535	Hu37D3-H9.v30,4 HVR-L1	RSSQSIVHSLGNTYFE
536	Hu37D3-H9.v30,5 HVR-L1	RSSQSIVHSIGNTYFE
537	Hu37D3-H9.v30,6 HVR-L1	RSSQSIVHSPGNTYFE
538	Hu37D3-H9.v30,7 HVR-L1	RSSQSIVHSFGNTYFE
539	Hu37D3-H9.v30,8 HVR-L1	RSSQSIVHSYGNTYFE
540	Hu37D3-H9.v30,9 HVR-L1	RSSQSIVHSHGNTYFE
541	Hu37D3-H9.v30,10 HVR-L1	RSSQSIVHSGKNTYFE
542	Hu37D3-H9.v30,11 HVR-L1	RSSQSIVHSRGNTYFE
543	Hu37D3-H9.v31,1 HVR-L1	RSSQSIVHSNAGTYFE
544	Hu37D3-H9.v31,2 HVR-L1	RSSQSIVHSNAVTYFE
545	Hu37D3-H9.v31,3 HVR-L1	RSSQSIVHSNAITYFE
546	Hu37D3-H9.v31,4 HVR-L1	RSSQSIVHSNAPTYFE
547	Hu37D3-H9.v31,5 HVR-L1	RSSQSIVHSNAFTYFE
548	Hu37D3-H9.v31,6 HVR-L1	RSSQSIVHSNAYTYFE
549	Hu37D3-H9.v31,7 HVR-L1	RSSQSIVHSNARTYFE
550	Hu37D3-H9.v31,8 HVR-L1	RSSQSIVHSNANVYFE
551	Hu37D3-H9.v31,9 HVR-L1	RSSQSIVHSNANIYFE
552	Hu37D3-H9.v31,10 HVR-L1	RSSQSIVHSNANPYFE
553	Hu37D3-H9.v31,11 HVR-L1	RSSQSIVHSNANFYFE
554	Hu37D3-H9.v31,12 HVR-L1	RSSQSIVHSNANNYFE
555	Hu37D3-H9.v31,13 HVR-L1	RSSQSIVHSNANNYFE
556	Hu37D3-H9.v31,14 HVR-L1	RSSQSIVHSNANRYFE
557	péptido 7-24 de Tau humana	EFEVMEDHAGTYGLGDRK
558	péptido 7-20 de Tau humana	EFEVMEDHAGTYGL
560	región variable de cadena pesada (VH) de Hu37D3.v39	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKLEWVAT INSGGTYYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
561	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3.v39	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFG SGVPSRFSGS GSGTDFTLTIT SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WFTFGQGTKVE IK
562	Hu37D3.v39 HVR-H1	SYGMS
563	Hu37D3.v39 HVR-H2	TINSGGTYYTYPDSVKG
564	Hu37D3.v39 HVR-H3	SYSGAMDY
565	Hu37D3.v39 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
566	Hu37D3.v39 HVR-L2	KVSNRFS
567	Hu37D3.v39 HVR-L3	FQGSLVPWT

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
568	cadena pesada de Hu37D3.v39 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
569	cadena ligera de Hu37D3.v39 IgG4-S228P.YTE	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFQGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRKAEK VQWVKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
570	región variable de cadena pesada de (VH) de Hu37D3.v40	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
571	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3.v40	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNTNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFQGQTKVE IK
572	Hu37D3.v40 HVR-H1	SYGMS
573	Hu37D3.v40 HVR-H2	TINSGGTYTYPDSVKG
574	Hu37D3.v40 HVR-H3	SYSGAMDY
575	Hu37D3.v40 HVR-L1	RSSQSIVHSNTNTYFE
576	Hu37D3.v40 HVR-L2	KVSNRFS
577	Hu37D3.v40 HVR-L3	FQGSLVPWT
578	cadena pesada de Hu37D3.v40 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
579	cadena ligera de Hu37D3.v40 IgG4-S228P.YTE	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNTNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFQGQTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRKAEK VQWVKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
580	Hu37D3.v41 heavy chain variable region (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
581	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3.v41	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGQTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFQGQTKVE IK
582	Hu37D3.v41 HVR-H1	SYGMS
583	Hu37D3.v41 HVR-H2	TINSGGTYTYPDSVKG
584	Hu37D3.v41 HVR-H3	SYSGAMDY
585	Hu37D3.v41 HVR-L1	RSSQSIVHSNGQTYFE
586	Hu37D3.v41 HVR-L2	KVSNRFS
587	Hu37D3.v41 HVR-L3	FQGSLVPWT

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
588	cadena pesada de Hu37D3.v41 IgG4-S228P.YTE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTITC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
589	cadena ligera de Hu37D3.v41 IgG4-S228P.YTE	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNQTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFGSGSGTDFTLTITLSSLQPEDFATYYCFQGSGLVPWTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
590	cadena pesada de Hu37D3-H9.v1 IgG4-S228P	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTITC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
591	cadena ligera de Hu37D3-H9.v1 IgG4	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNQTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFGSGSGTDFTLTITLSSLQPEDFATYYCFQGSGLVPWTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
592	MAPT(10-24)	VMEDHAGTYGLGDRK
593	MAPT(2-24)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRK
594	MAPT(2-34)	AEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQD
595	MAPT(10-44)	VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK
596	MAPT(2-24)Y18A	AEPRQEFVEMEDHAGTAGLGDRK
597	MAPT(2-24)L20A	AEPRQEFVEMEDHAGTYGAGDRK
598	hu113F5-F7.LC1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASRRFSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQFSTYPYTFGQGTKVEIK
599	hu113F5-F7.LC2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASRRFSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQFSTYPYTFGQGTKVEIK
600	hu113F5-F7.LC3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVGTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASRRFSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQFSTYPYTFGQGTKVEIK
601	hu113F5-F7.LC4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVGTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASRRFSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQFSTYPYTFGQGTKVEIK
603	región variable de cadena pesada (VH)de Hu37D3-H9.v76	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
604	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v76	DDLLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNQNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRFGSGVPSRFGSGSGTDFTLTKSRVEAEDGVVYYCFQGTLVPTWTFGGQGTKVEIK

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
605	Hu37D3-H9.v76 HVR-H1 Hu37D3-H9.v83 HVR-H1 Hu37D3-H9.v93 HVR-H1	SYGMS
606	Hu37D3-H9.v76 HVR-H2 Hu37D3-H9.v83 HVR-H2 Hu37D3-H9.v93 HVR-H2	TINSGGTRTYYPDSVKG
607	Hu37D3-H9.v76 HVR-H3 Hu37D3-H9.v83 HVR-H3 Hu37D3-H9.v93 HVR-H3	SYSGAMDY
608	Hu37D3-H9.v76 HVR-L1 Hu37D3-H9.v83 HVR-L1 Hu37D3-H9.v93 HVR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
609	Hu37D3-H9.v76 HVR-L2 Hu37D3-H9.v83 HVR-L2 Hu37D3-H9.v93 HVR-L2	KVSNRFS
610	Hu37D3-H9.v76 HVR-L3 Hu37D3-H9.v83 HVR-L3 Hu37D3-H9.v93 HVR-L3	FQGTLPWVT
611	cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v76	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKLEWVAT INSGGTRTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
612	cadena pesada des-K de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v76	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKLEWVAT INSGGTRTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLG
613	cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v76	DDLTTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGTLVP WFTGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRKAK VQWVKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRRGEC
614	región variable de cadena pesada (VH)de Hu37D3-H9.v83	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKLEWVAT INSGGTRTYYPDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
615	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v83	DDLTTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YQQRPGQSPR LLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGTLVP WFTGQGTKVE IK

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
616	cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v83	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYT PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTITYC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
617	cadena pesada des-K de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v83	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYT PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTITYC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLG
618	cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v83	DDLLTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YQRPQGQSPR LLIYKVSNR FSGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCFQGTLPV WTFGQGTKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
619	región variable de cadena pesada (VH) de Hu37D3-H9.v93	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYT PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
620	región variable de cadena ligera (VL) de Hu37D3-H9.v93	EDLLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNNGNTYLEW YQKPKGKSPK LLIYKVSNR FSGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGTLPV WTFGQGTKE IK
621	cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v93	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYT PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTITYC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
622	cadena pesada des-K de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v93	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTRTYT PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGKTITYC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLG

ES 3 021 263 T3

(continuación)

SEC ID NO	Descripción	Secuencia
623	cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v93	EDLLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNGNTYLEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRFGVPSRFSGS GSGTDFTLT SSLQPEDFAT YYCFQGTLVP WFTGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTLS SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
624	residuos 2 a 24 de Tau humana	AEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRK

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo comprende la HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 605; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 606; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 607; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 608; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 609; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 610.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado o quimérico.
3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende:
 - a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 603;
 - b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 604;
 - c) una VH como en (a) y una VL como en (b);
 - d) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 614;
 - e) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 615;
 - f) una VH como en (d) y una VL como en (e);
 - g) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 619;
 - h) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es por lo menos 95 % idéntica a la SEC ID NO: 620;
 - i) una VH como en (g) y una VL como en (h);
 - j) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 603;
 - k) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 604;
 - l) una VH como en (j) y una VL como en (k);
 - m) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la SEC ID NO: 614;
 - n) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la SEC ID NO: 615;
 - o) una VH como en (m) y una VL como en (n);
 - p) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 619;
 - q) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 620; o
 - r) una VH como en (p) y una VL como en (q).
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 603 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 604, 615 y 620; (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 614 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 604, 615 y 620; (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 619 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 604, 615 y 620; (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 603, 614 y 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 604; (e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 603, 614 y 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 615; o (f) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada de las SEC ID NO: 603, 614 y 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 620.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 603 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 604; (b) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 614 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 615; o (c) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 619 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 620.
6. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo comprende:
 - a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 613; o
 - b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y

- una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613; o
- c) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 618; o
- d) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618; o
- e) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95 %, por lo menos 97 % o por lo menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEC ID NO: 623; o
- f) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.
7. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 611 o la SEC ID NO: 612 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 613; (b) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 616 o la SEC ID NO: 617 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 618; o (c) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 621 o la SEC ID NO: 622 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 623.
8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1 o un anticuerpo de IgG4.
9. El anticuerpo aislado de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgG4 y comprende las mutaciones M252Y, S254T y T256E.
10. El anticuerpo aislado de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el anticuerpo comprende una mutación S228P.
11. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 10, que es un fragmento de anticuerpo.
12. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une a cada una de Tau monomérica, Tau fosforilada, Tau no fosforilada y Tau oligomérica con una K_D de menos de 100 nM, menos de 75 nM, menos de 50 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM o menos de 1 nM, en donde K_D se determina por resonancia de plasmones superficiales a 37 °C.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica al anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
14. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 14 en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo.
16. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un segundo agente terapéutico.
17. Un anticuerpo etiquetado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una etiqueta detectable.
18. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
19. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso como un medicamento.
20. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o la composición farmacéutica de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de una tauopatía en un individuo, opcionalmente en donde la tauopatía es una tauopatía neurodegenerativa.
21. El anticuerpo aislado o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 20, en donde la tauopatía se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt–Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann–Sträussler–Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, esclerosis lateral amiotrófica/complejo de parkinsonismo–demencia de Guam, enfermedad de las neuronas motoras distinta a Guam con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo

vinculado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden–Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann–Pick tipo C, degeneración palido–ponto–nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, parkinsonismo posencefalítico y distrofia miotónica.

- 5 22. El anticuerpo aislado o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 20 o 21, en donde la tauopatía es enfermedad de Alzheimer o parálisis supranuclear progresiva.
- 10 23. El anticuerpo aislado o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde el anticuerpo es para su uso con al menos una terapia adicional, opcionalmente en donde la terapia adicional se selecciona entre fármacos neurológicos, corticosteroides, antibióticos, agentes antivirales, anticuerpos antiTau, anticuerpos anti-beta amiloides, anticuerpos anti-BACE1 e inhibidores de BACE1.
- 15 24. Un método *in vitro* para detectar ovillos neurofibrilares, hilos del neurópilo o neuritas distróficas que comprende poner en contacto una muestra con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; opcionalmente en donde la muestra es una muestra de cerebro, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de sangre.

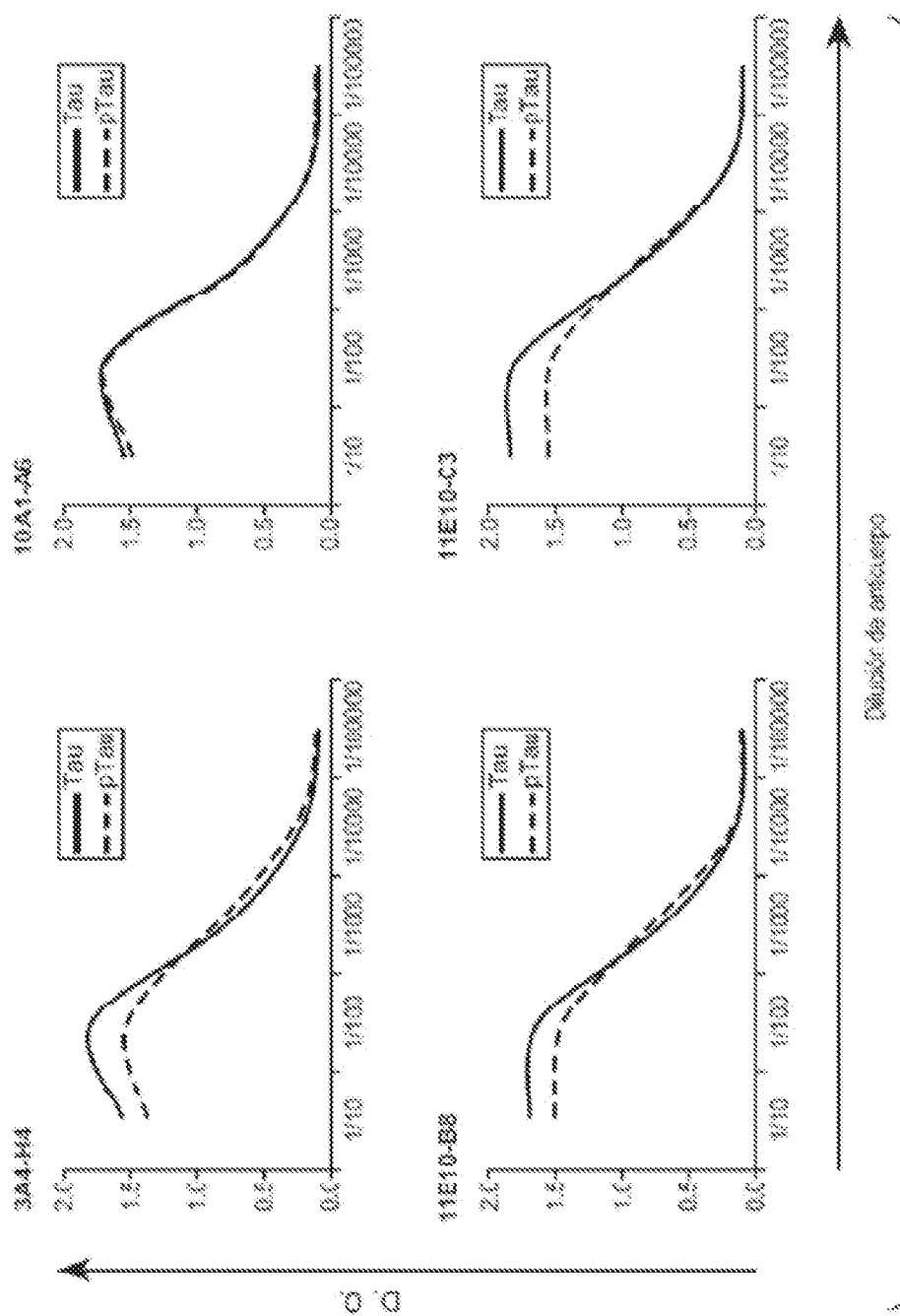


FIG. 1A

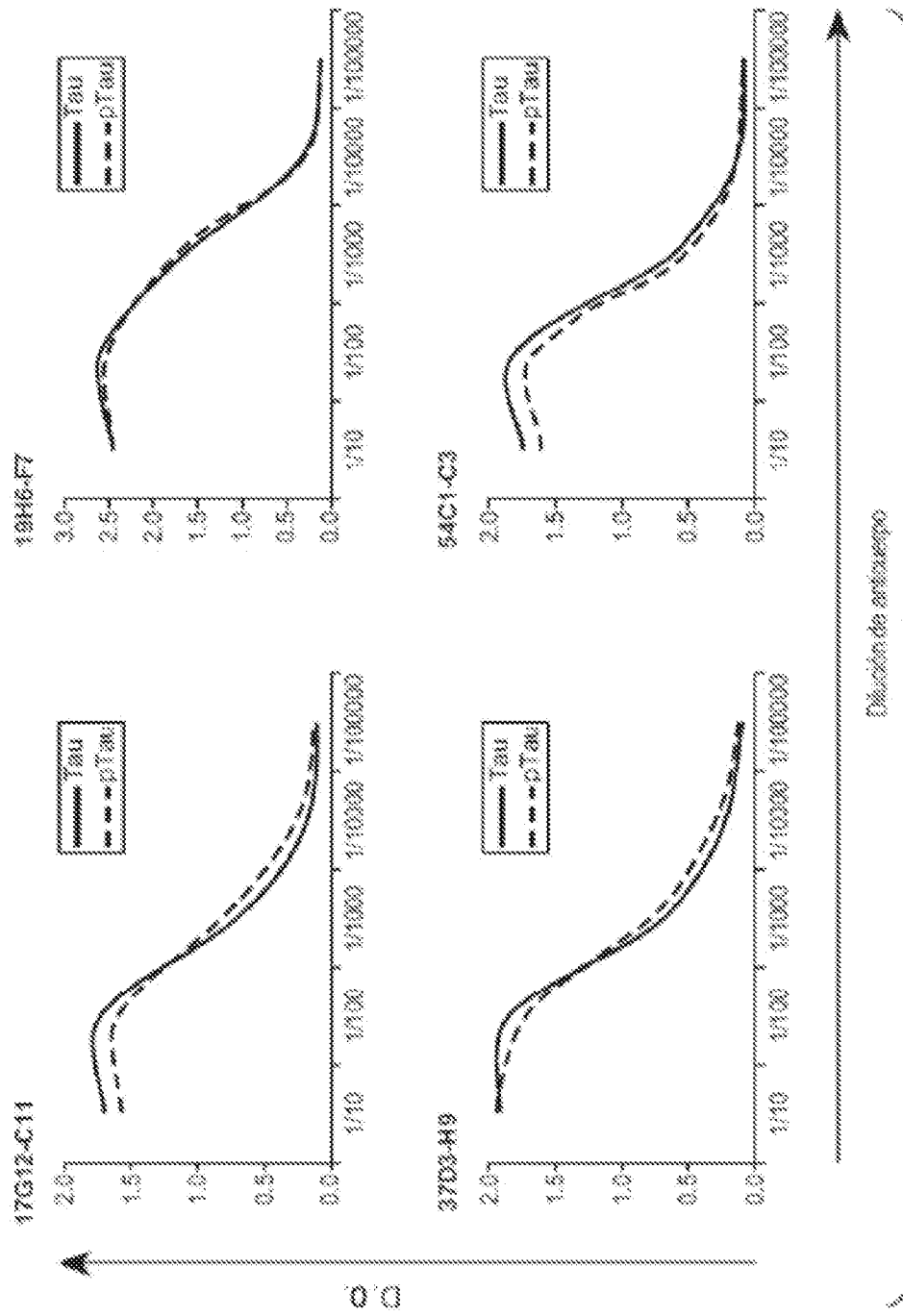


FIG. 1B

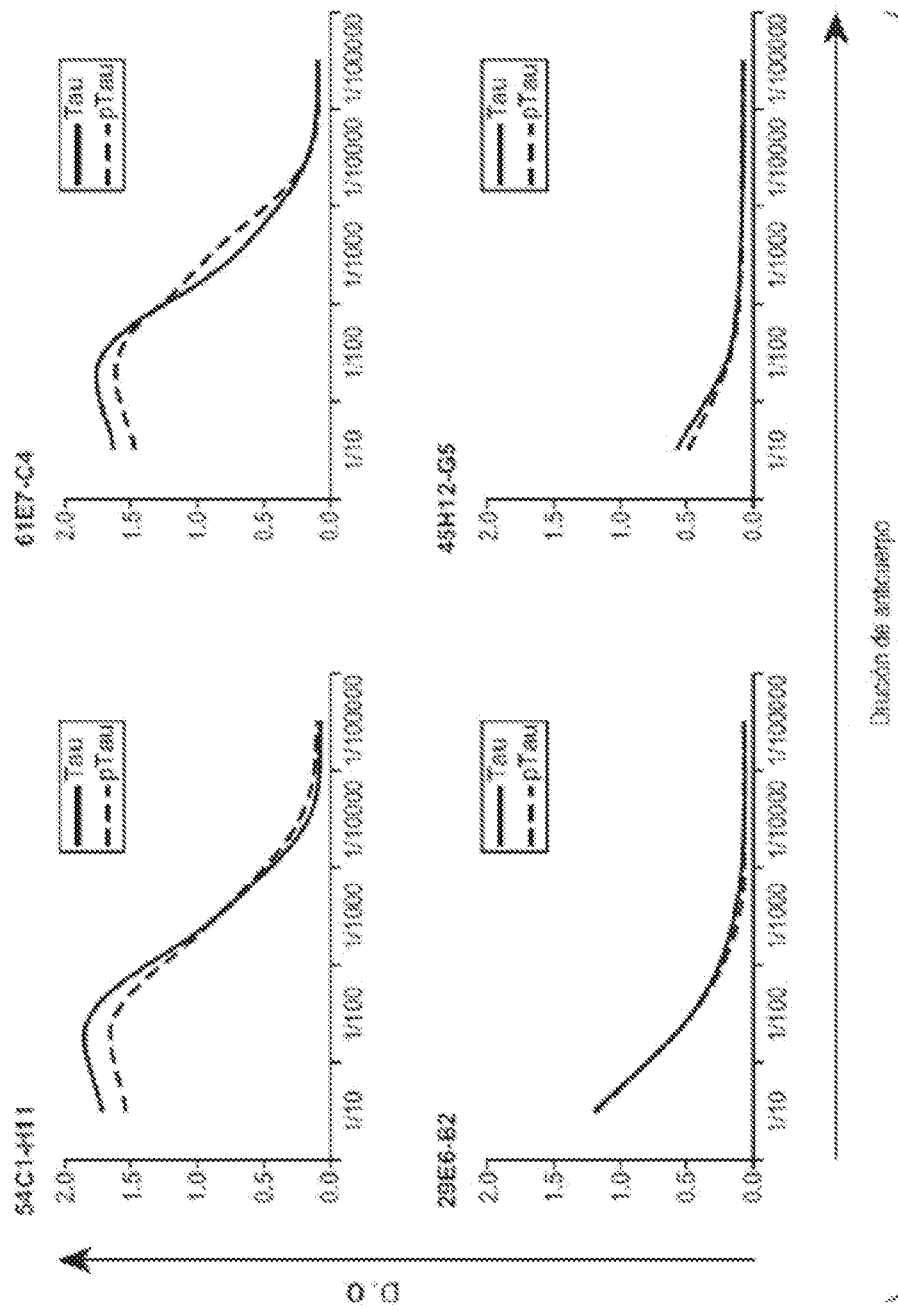
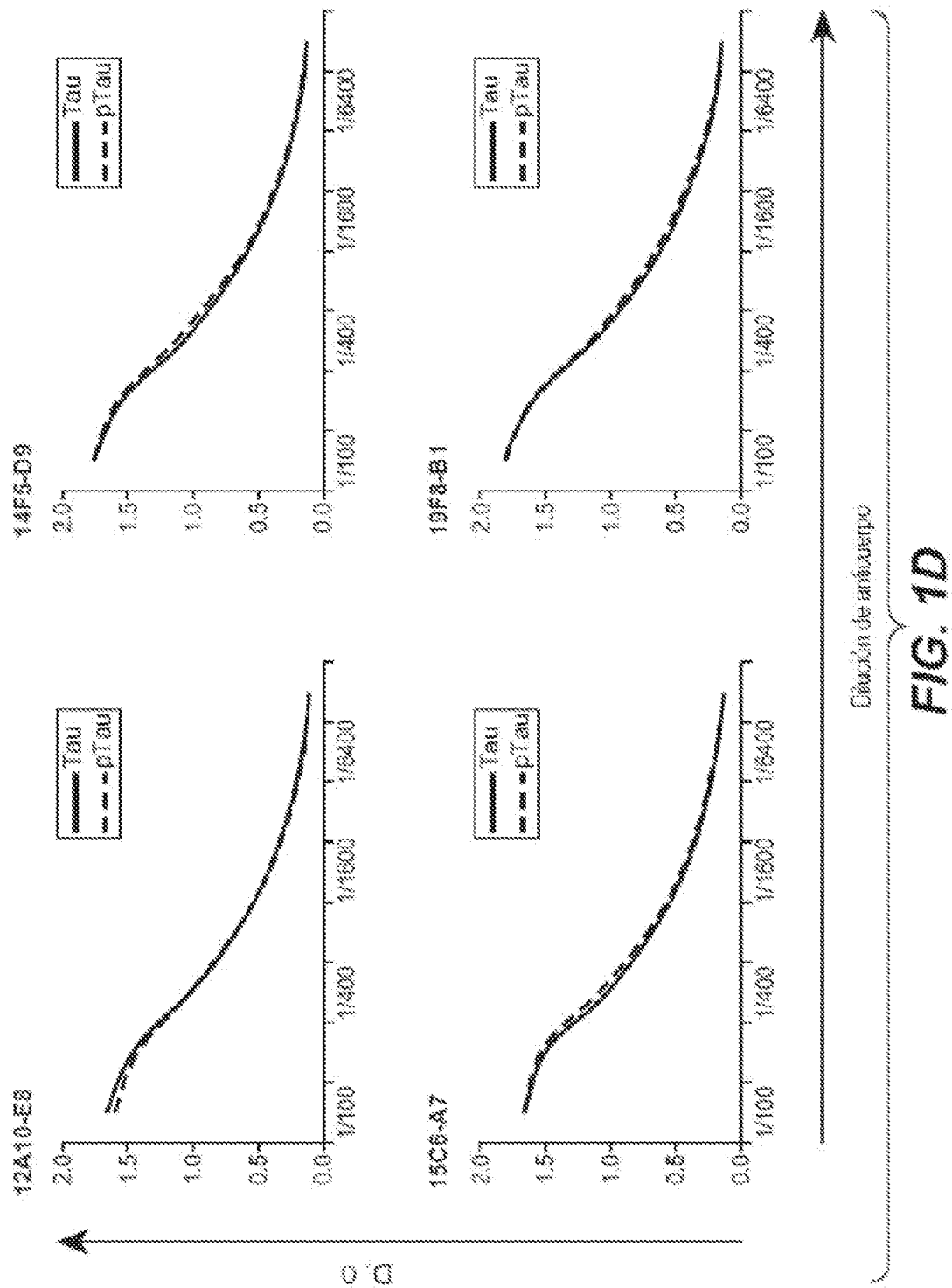


FIG. 1C



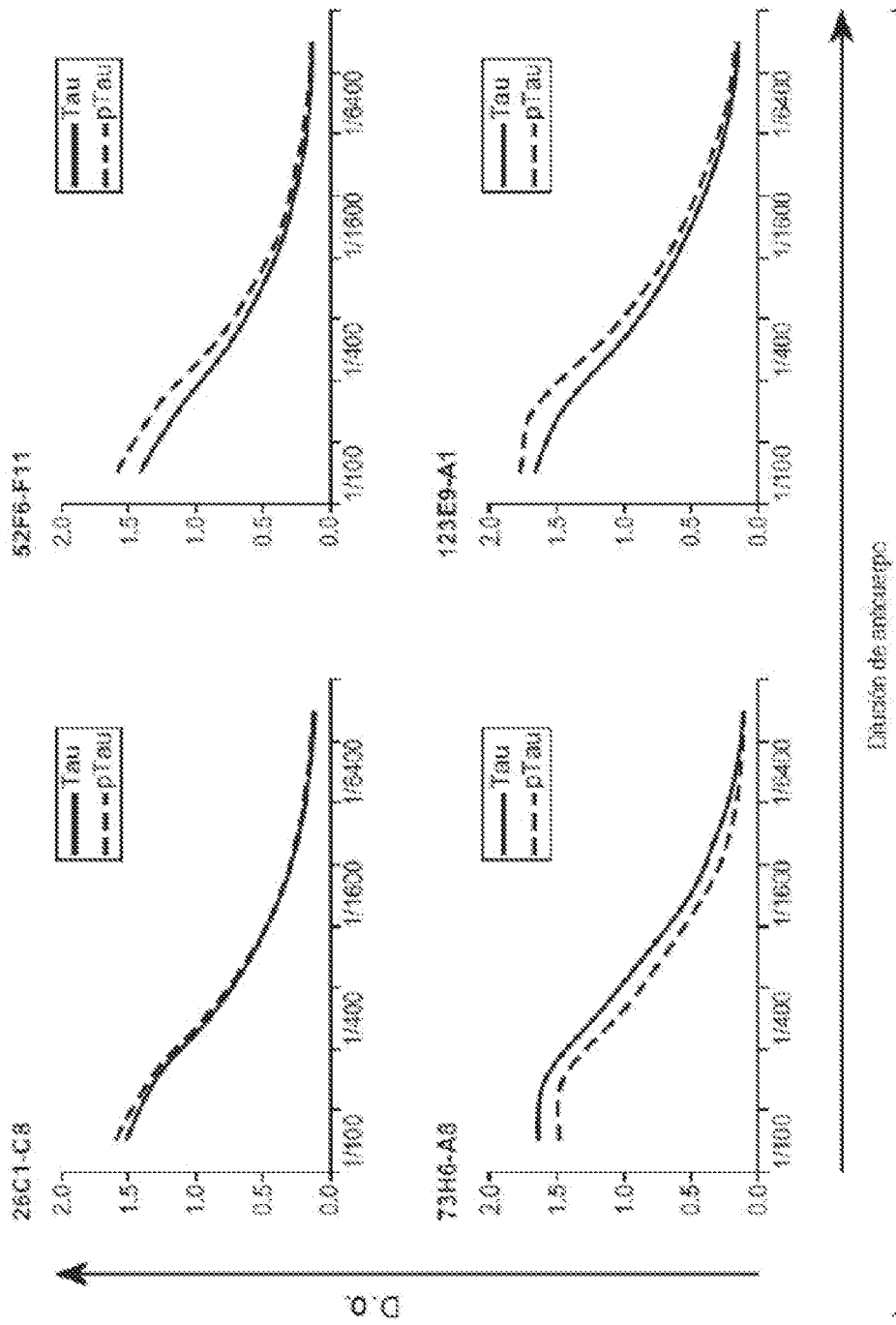


FIG. 1E

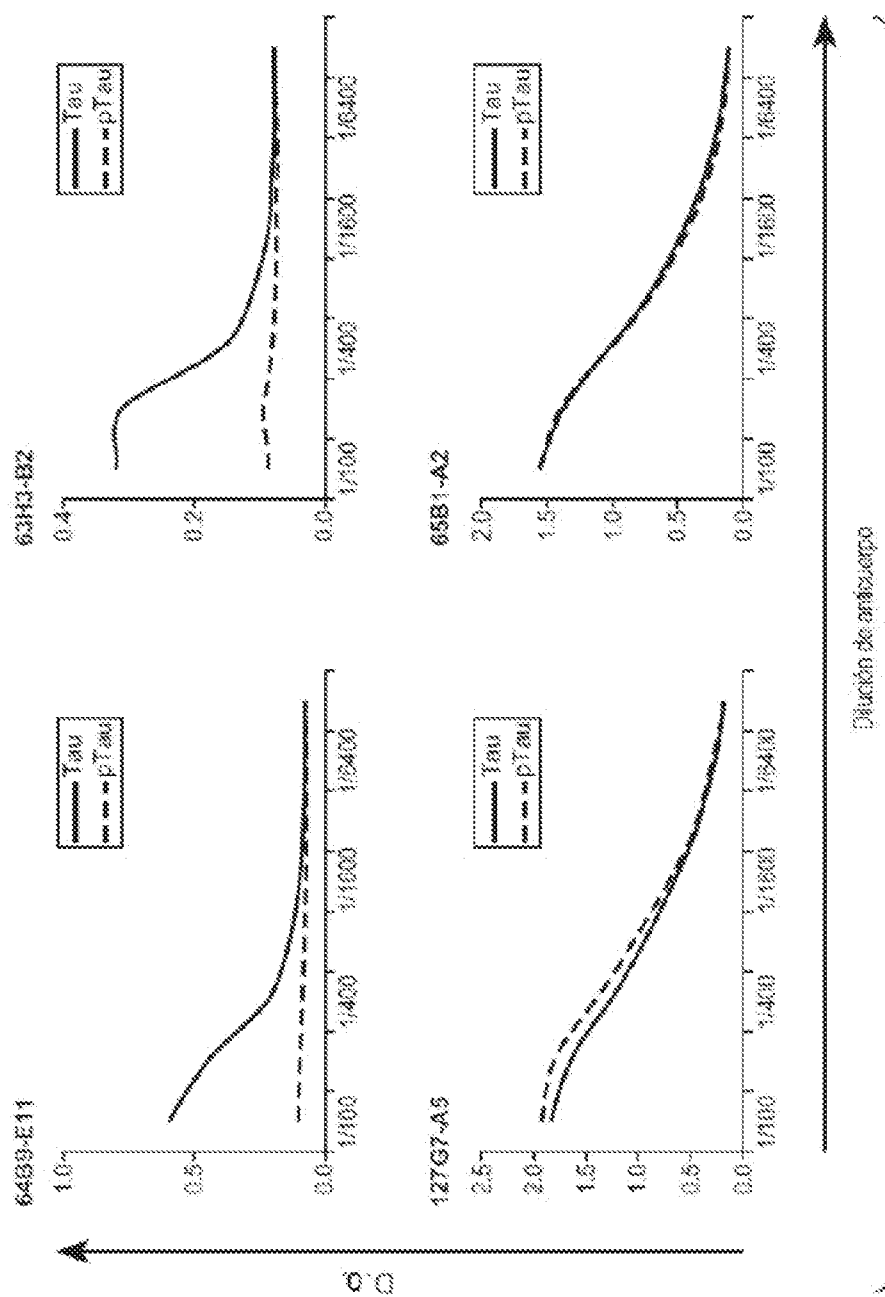
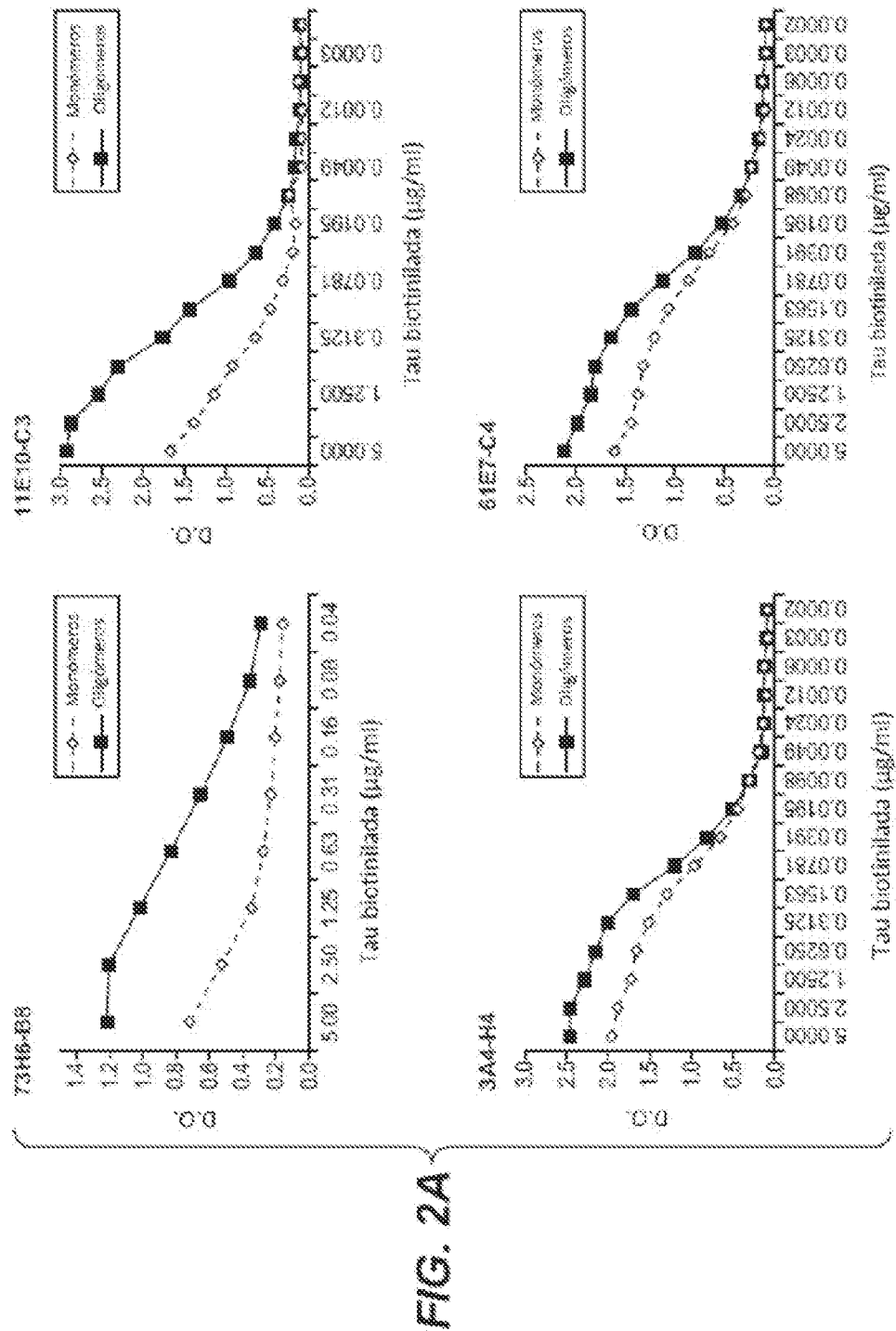


FIG. 1F



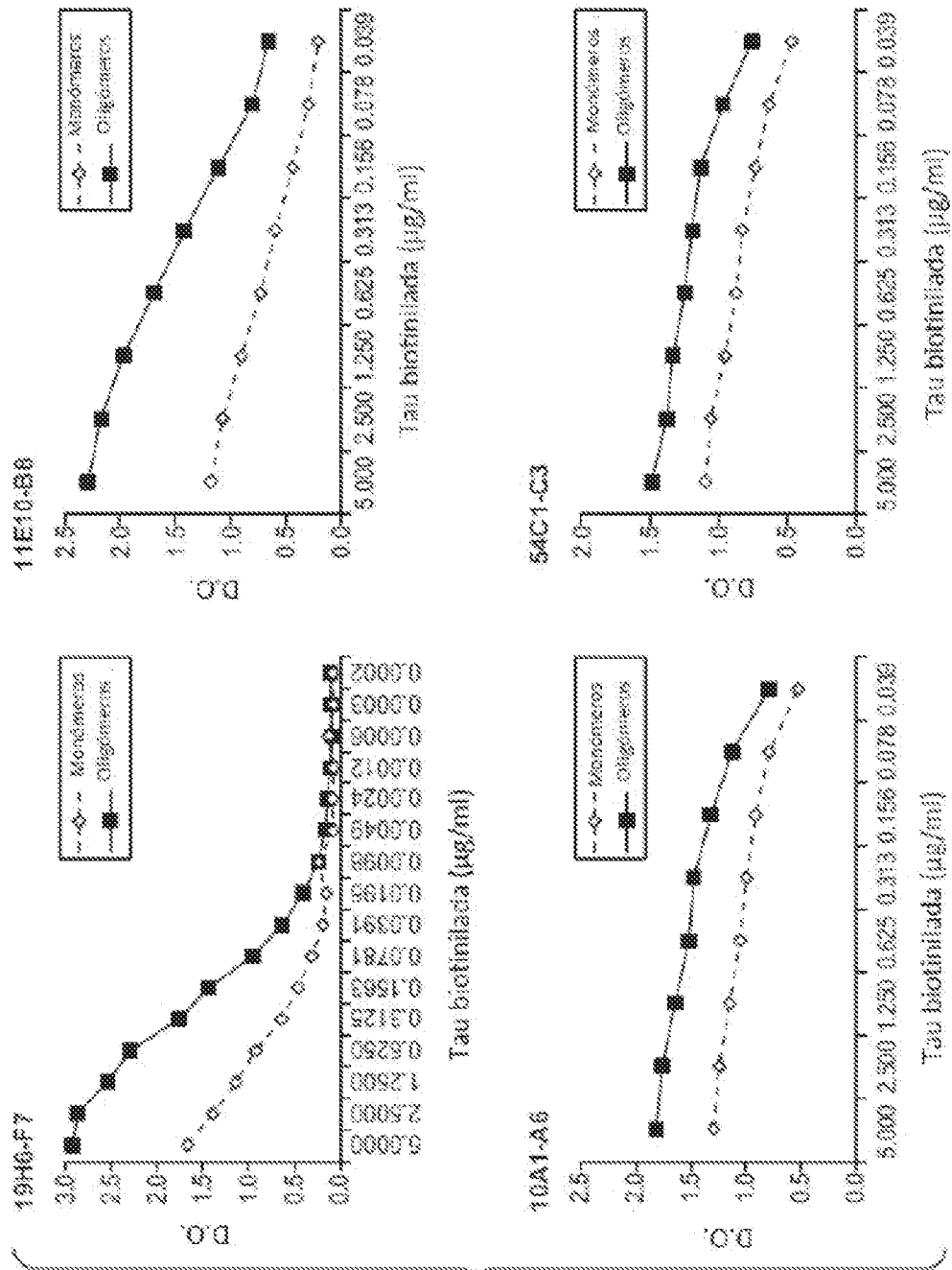


FIG. 2B

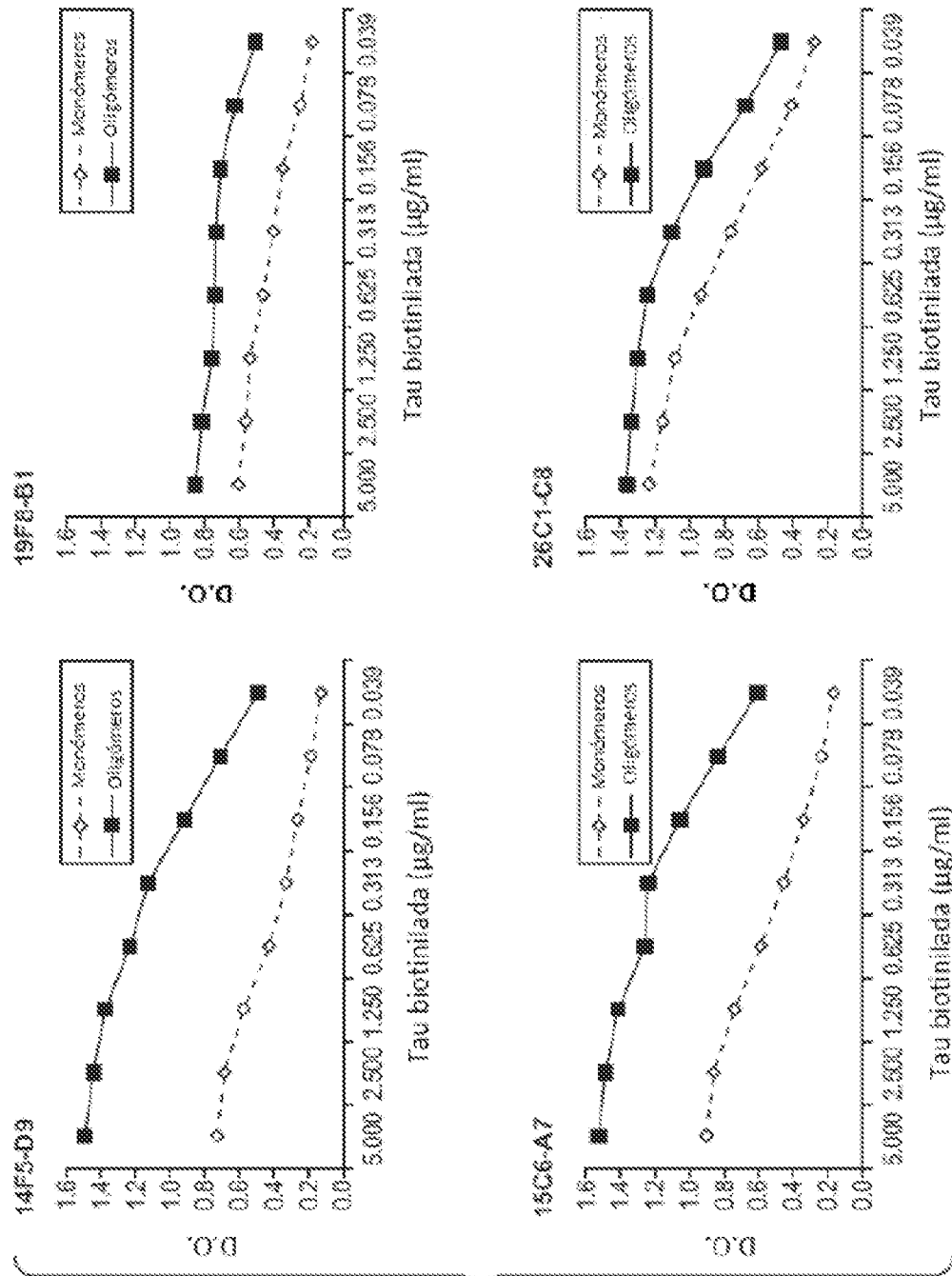
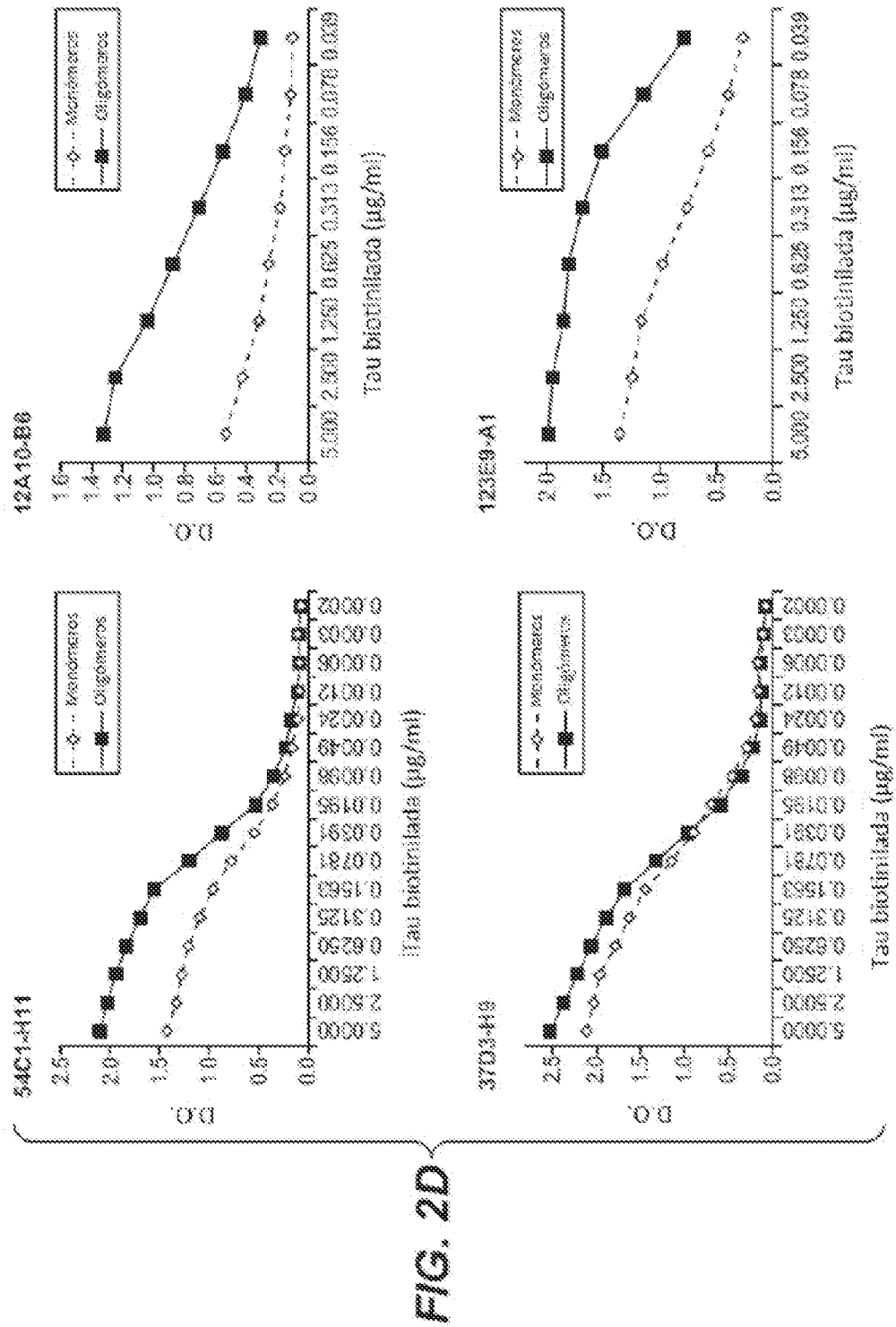


FIG. 2C



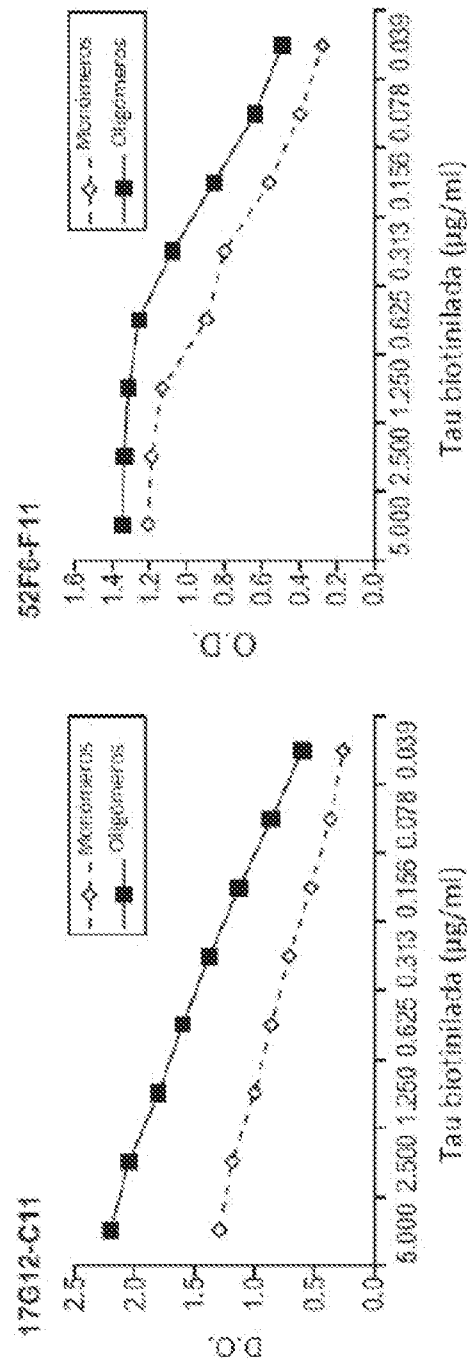


FIG. 2E

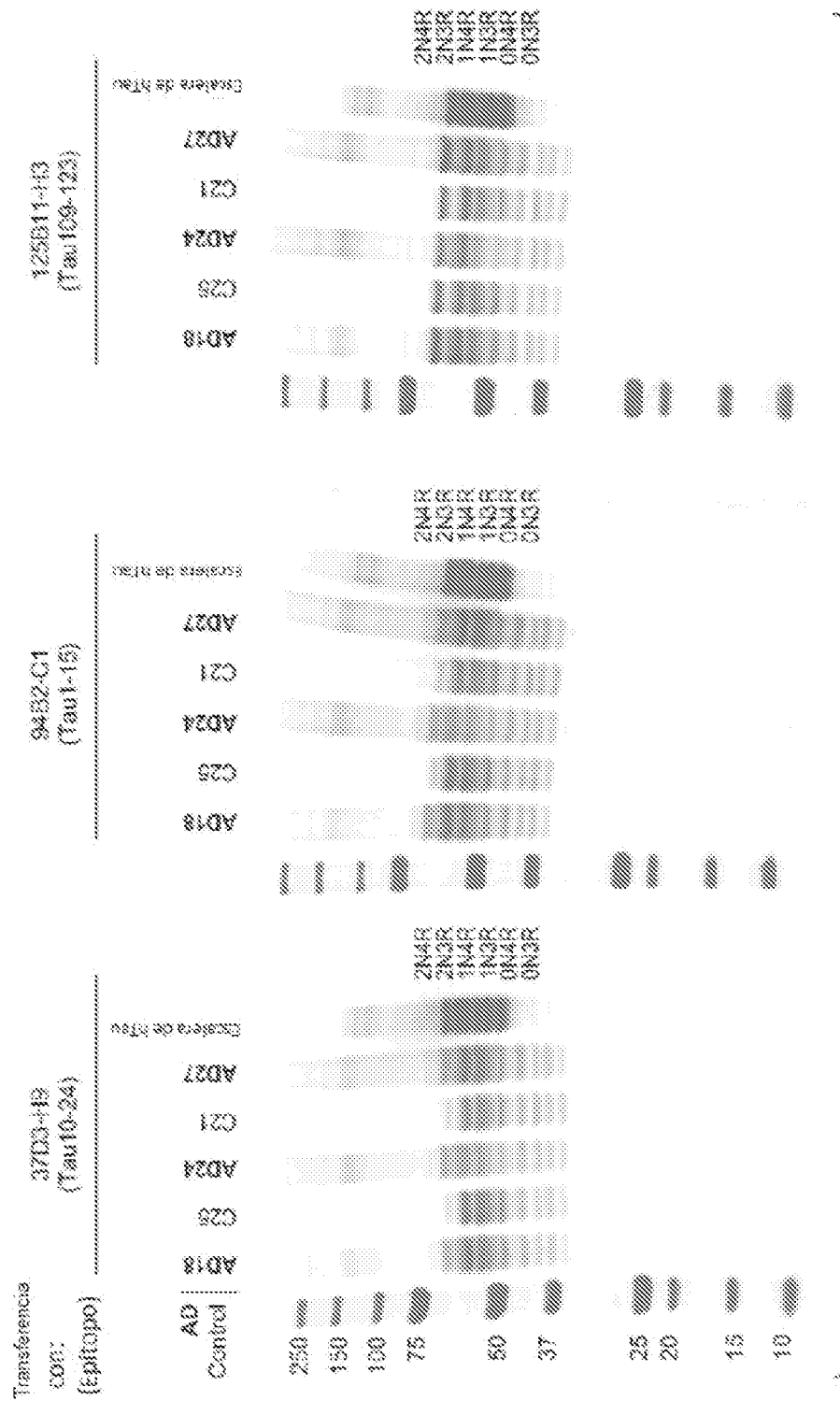


FIG. 3

FIG. 4A

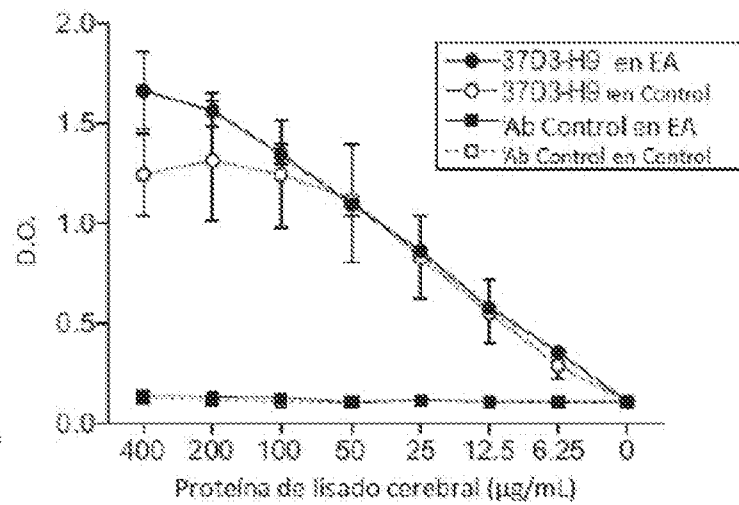


FIG. 4B

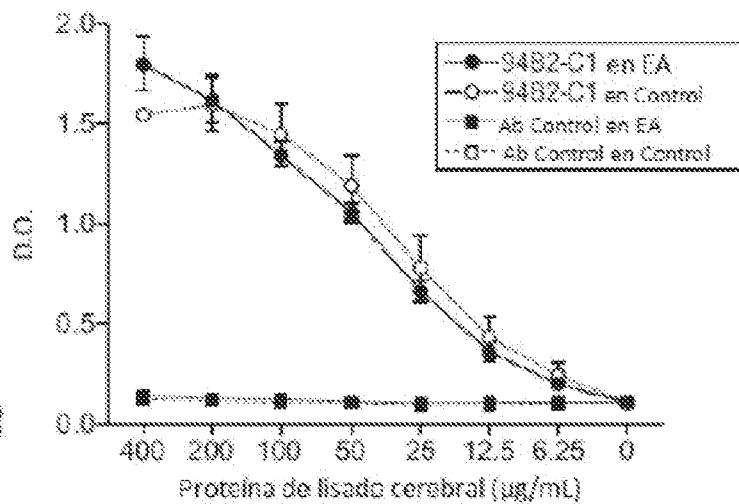
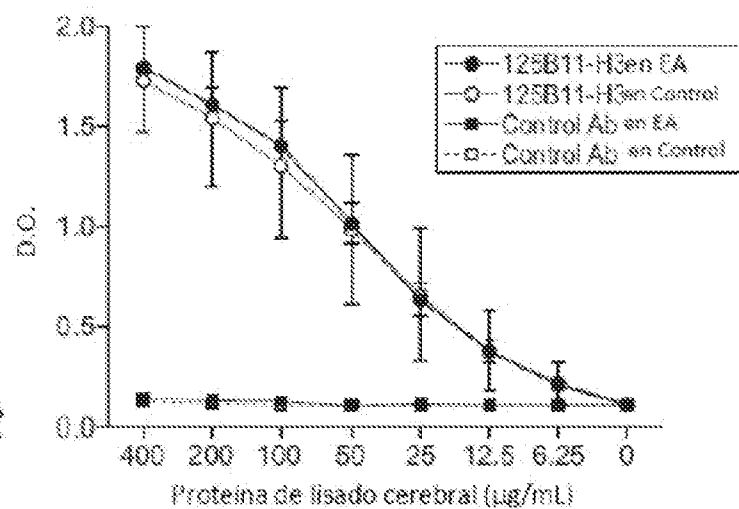


FIG. 4C



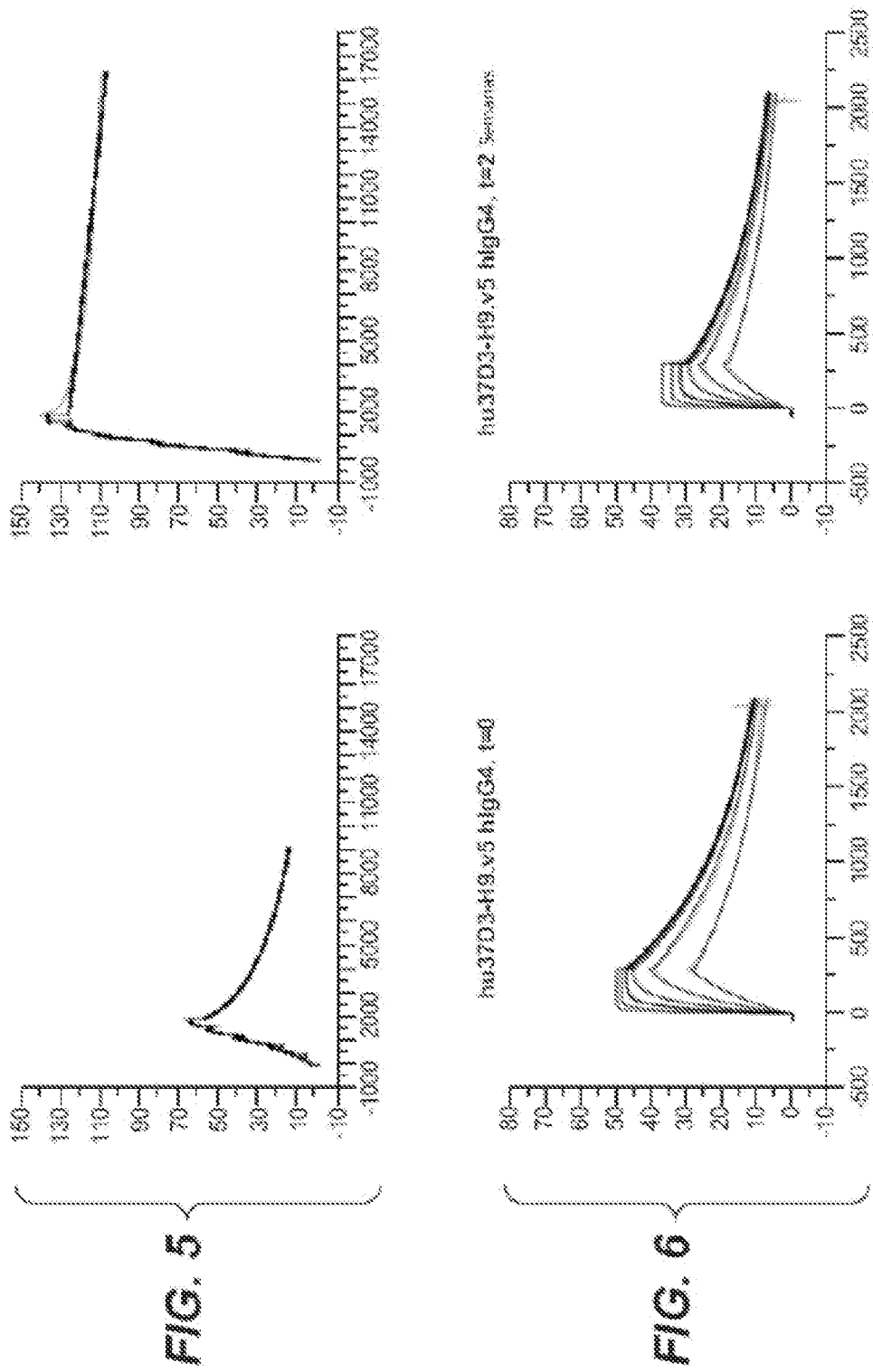


FIG. 7

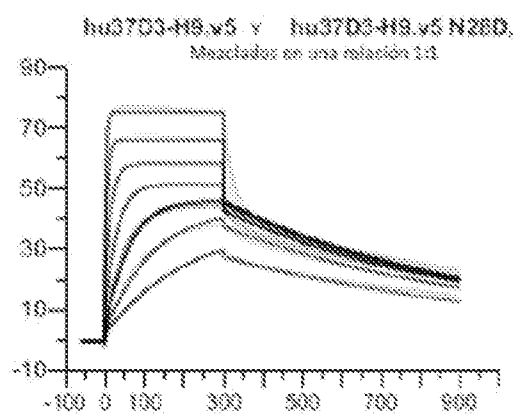
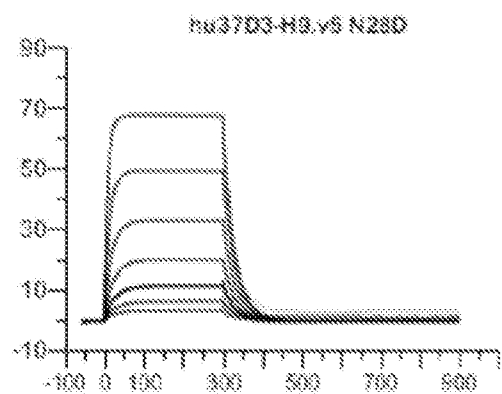
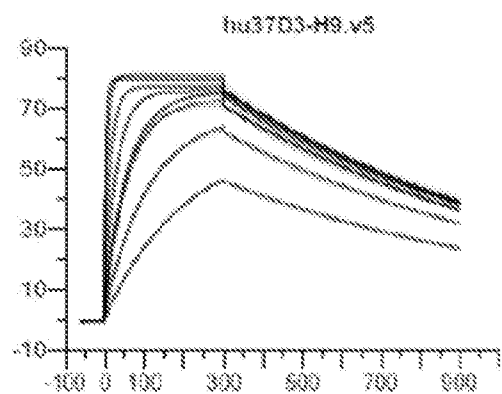


FIG. 8

FIG. 8A
FIG. 8B
FIG. 8C
FIG. 8D

FIG. 8A

Anticuerpo	KD (nM)	Índice de Estabilidad	Chi2 < 10% Rmax y Rmax normalizada (antes de tensión) > 0.1?	Residuos de V1 en lugares seleccionados (Numeración de Kabat)										SEC ID:		
				1	2	4	27D	27E	28	29	30	31	32		33	35
Control sin tensión (media, n=9)	1.0	106%		E	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L	350
hu37D3-H9 v5	0.9	73%	Si	E	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L	351
hu37D3-H9 v5.1	4.0	72%	Si	E	D	L	H	S	N	A	N	T	Y	F	L	352
hu37D3-H9 v5.2	10.9	97%	Si	E	D	L	H	S	S	G	N	T	Y	F	L	353
hu37D3-H9 v5.3	73.2	70%	Si	E	D	L	H	S	D	G	N	T	Y	F	L	354
hu37D3-H9 v5.4	36.1	78%	-	E	D	L	H	S	Q	G	N	T	Y	F	L	355
hu37D3-H9 v5.5	64.6	75%	-	E	D	L	H	S	E	G	N	T	Y	F	L	356
hu37D3-H9 v5.6	36.6	67%	Si	E	D	L	H	S	A	G	N	T	Y	F	L	357
hu37D3-H9 v5.7	13.0	67%	Si	E	D	L	H	S	N	G	D	T	Y	F	L	358
hu37D3-H9 v5.8	2.2	90%	Si	E	D	L	H	S	N	G	Q	T	Y	F	L	359
hu37D3-H9 v5.9	6.3	95%	Si	E	D	L	H	S	N	G	E	T	Y	F	L	360
hu37D3-H9 v5.10	4.7	76%	Si	E	D	L	H	S	N	G	A	T	Y	F	L	361
hu37D3-H9 v5.11	97.7	71%	Si	E	D	L	H	S	N	G	S	T	Y	F	L	362
hu37D3 v28	0.9	76%	Si	D	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L	363
hu37D3 v28.A2	32.6	72%	Si	D	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	H	364
hu37D3 v28.A4	1.2	96%	Si	D	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	L	L	365
hu37D3 v28.A6	38.3	82%	Si	D	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	L	H	366
hu37D3 v28.A8	1.6	57%	Si	D	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L	367

	SEX	ID
hu3TD3.v28.A10	M	368
hu3TD3.v28.A12	M	369
hu3TD3.v28.A14	M	370
hu3TD3.v28.A16	L	371
hu3TD3.v28.A18	V	372
hu3TD3.v28.A20	V	373
hu3TD3.v28.A22	V	374
hu3TD3.v28.A24	V	375
hu3TD3.v28.A26	V	376
hu3TD3.v28.A28	V	377
hu3TD3.v28.A30	V	378
hu3TD3.v28.B1	D	379
hu3TD3.v28.B2	D	380
hu3TD3.v28.B3	D	381
hu3TD3.v28.B4	D	382
hu3TD3.v28.B6	D	383
hu3TD3.v28.B7	D	384
hu3TD3.v28.B8	D	385
hu3TD3.v28.C1	D	386
hu3TD3.v28.C2	D	387
hu3TD3.v28.D1	D	388

[illegible]

Anticuerpo	KD (nM)	Índice de Estabilidad	Chi2 < 10% R _{max} y R _{max} normalizada (antes de tensión) > 0.1?	Residuos de VL en lugares seleccionados (Numeración de Kabat)										SEC ID	
				1	2	4	27D	27E	28	29	30	31	32		33
Control sin tensión (media, n=9)	1.0	106%	Si	E	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.E1	20.1	46%	Si	D	D	L	N	S	N	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.E2	22.5	26%	Si	D	D	L	Q	S	N	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.E3	1.1	36.4%	*	D	D	L	D	S	D	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.F1	2.1	81%	Si	D	D	L	H	S	N	T	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.F2	1.9	51%	Si	D	D	L	H	T	N	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.F3	0.5	70%	Si	D	D	L	H	T	N	A	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.51	35.6	74%	*	E	D	L	H	S	H	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.52	17.6	80%	Si	E	D	L	H	S	K	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.53	22.9	76%	Si	E	D	L	H	S	R	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.54	24.8	82%	Si	E	D	L	H	S	L	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.55	2.6	82%	Si	D	D	L	H	S	N	Q	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.56	5.4	76%	Si	D	D	L	H	S	N	Y	N	T	Y	F	L
hu37D3.v28.57	4.4	88%	Si	D	D	L	H	S	N	F	N	T	Y	F	L
hu37D3.v29.1	13.5	70%	Si	E	D	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L
hu37D3.v29.2	2.6	88%	Si	E	D	L	H	S	N	G	Q	T	Y	F	L
hu37D3.v29.3	5.6	93%	Si	E	D	L	H	S	N	G	E	T	Y	F	L
hu37D3.v29.4	4.9	76%	Si	E	D	L	H	S	N	G	A	T	Y	F	L
hu37D3.v29.5	1.4	64%	Si	E	D	L	H	S	N	G	H	T	Y	F	L
hu37D3.v29.6	1.4	62%	Si	E	D	L	H	S	N	G	K	T	Y	F	L
hu37D3.v29.7	4.6	90%	Si	E	D	L	H	S	N	G	L	T	Y	F	L
hu37D3.v29.8	40.9	77%	-	E	D	L	H	S	N	A	D	T	Y	F	L
hu37D3.v29.9	7.3	86%	Si	E	D	L	H	S	N	A	Q	T	Y	F	L
hu37D3.v29.10	17.4	100%	Si	E	D	L	H	S	N	A	E	T	Y	F	L

FIG. 8C

[illegible]

08/07/14

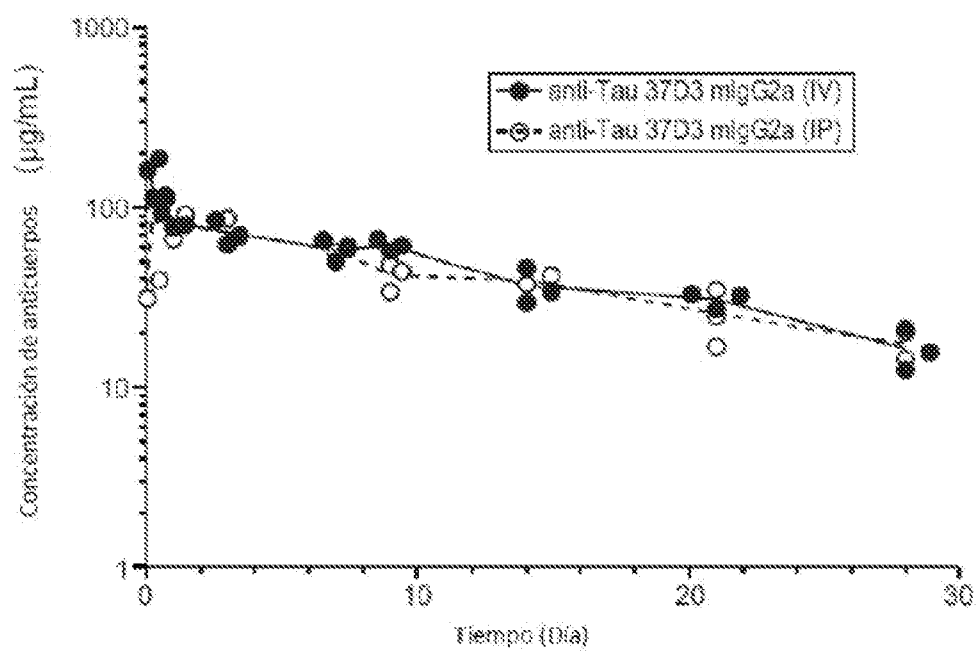
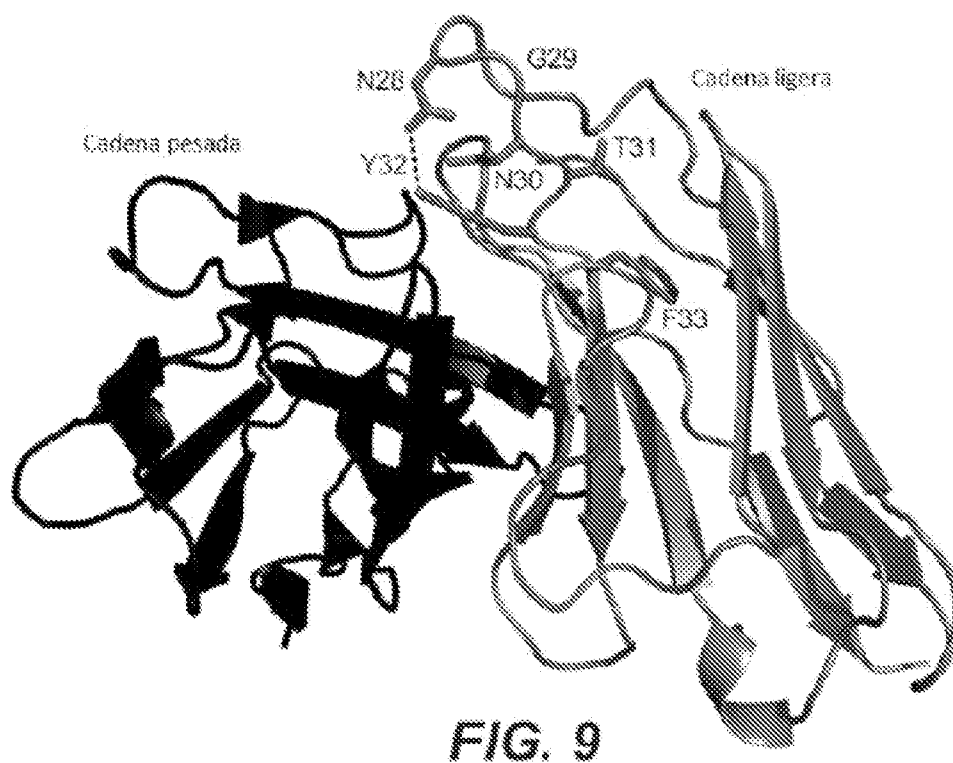


FIG. 10

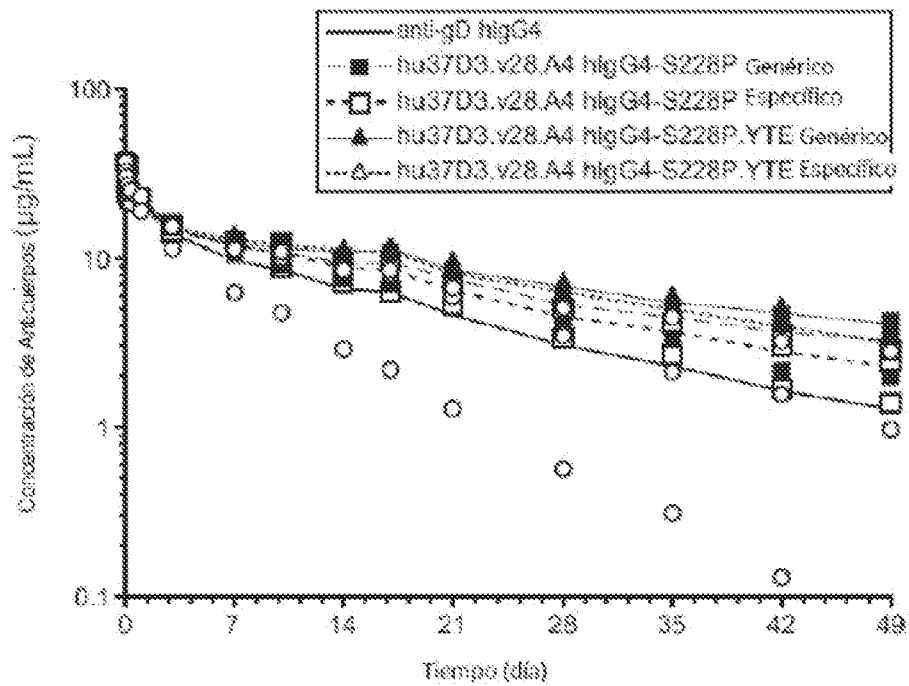


FIG. 11

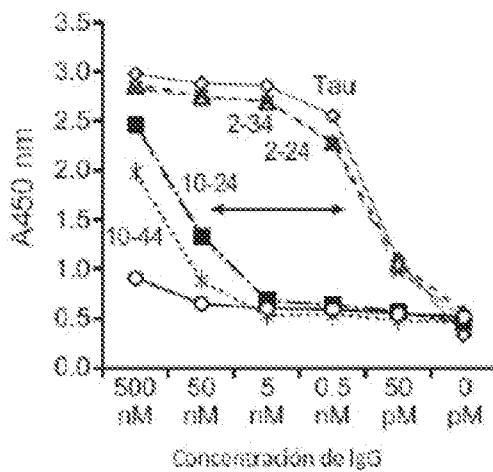


FIG. 12B

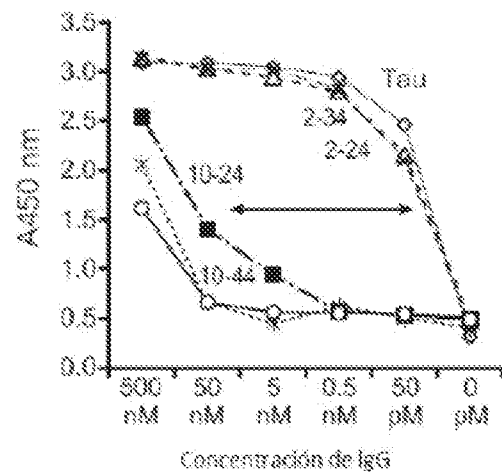


FIG. 12C

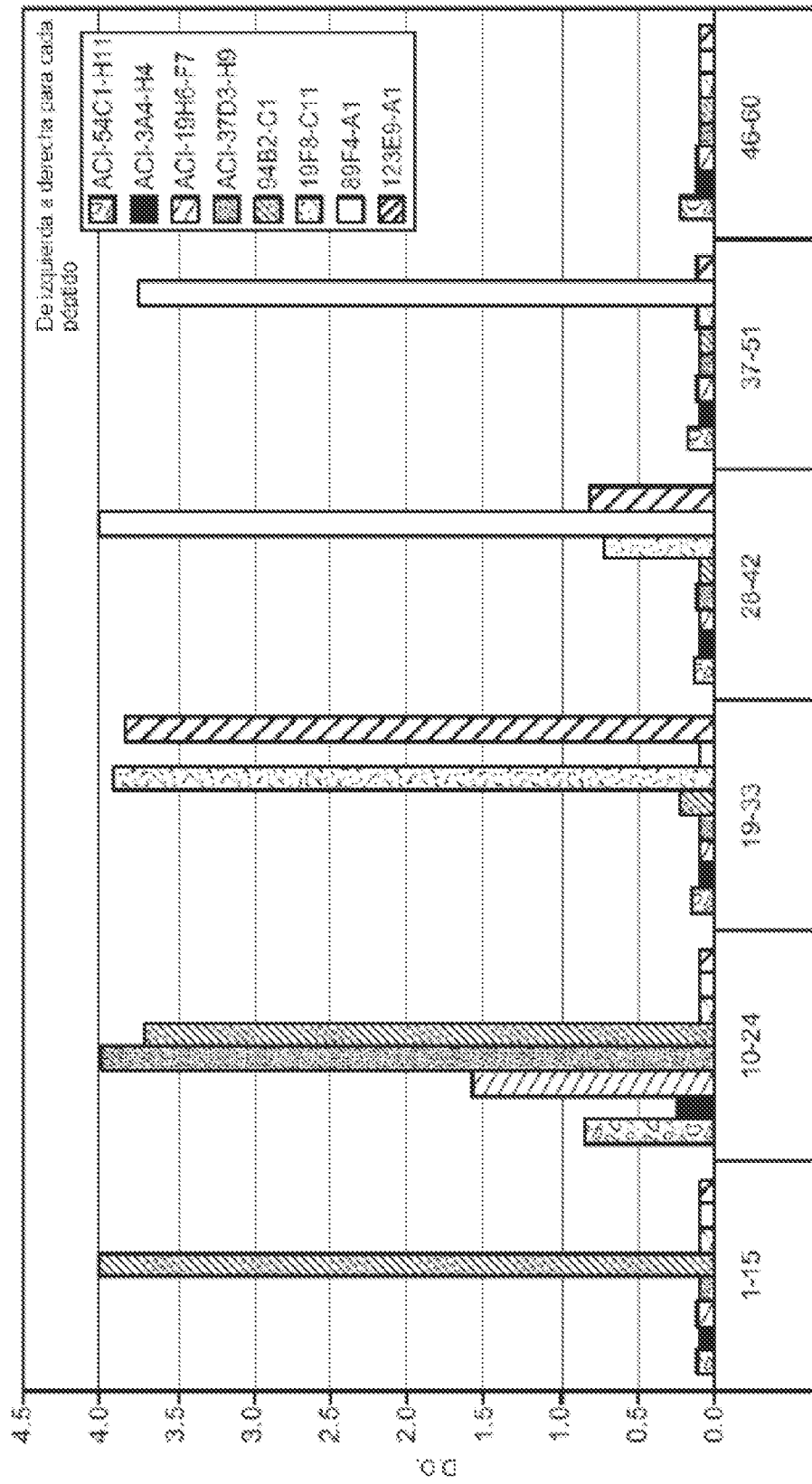


FIG. 12A

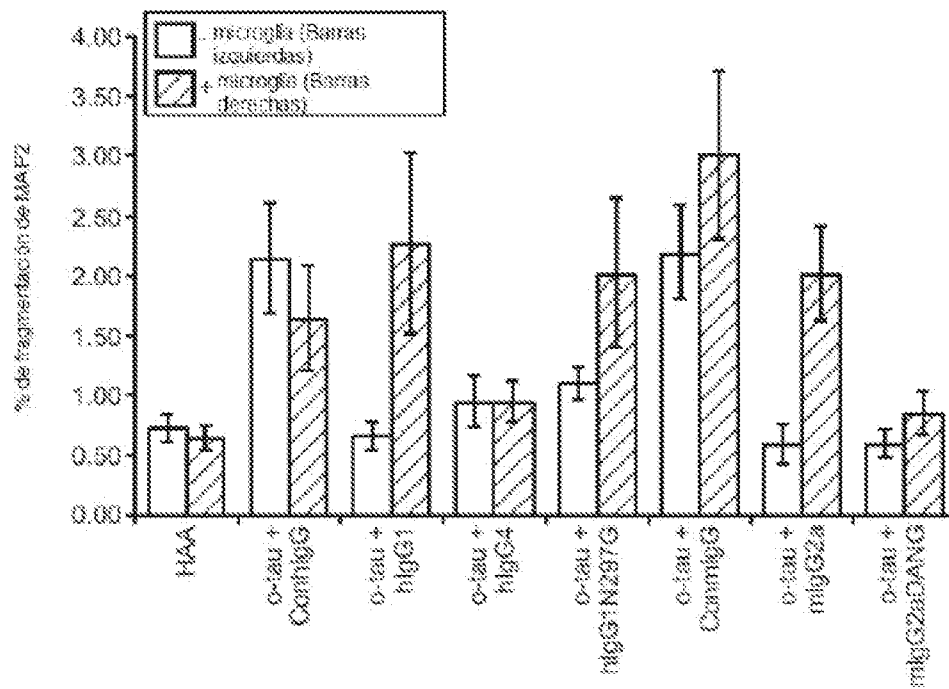


FIG. 13A

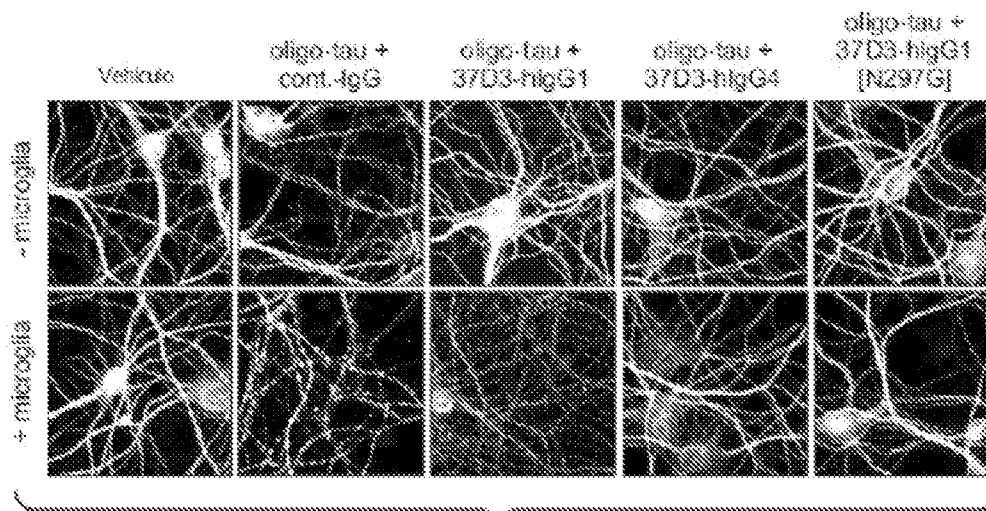


FIG. 13B

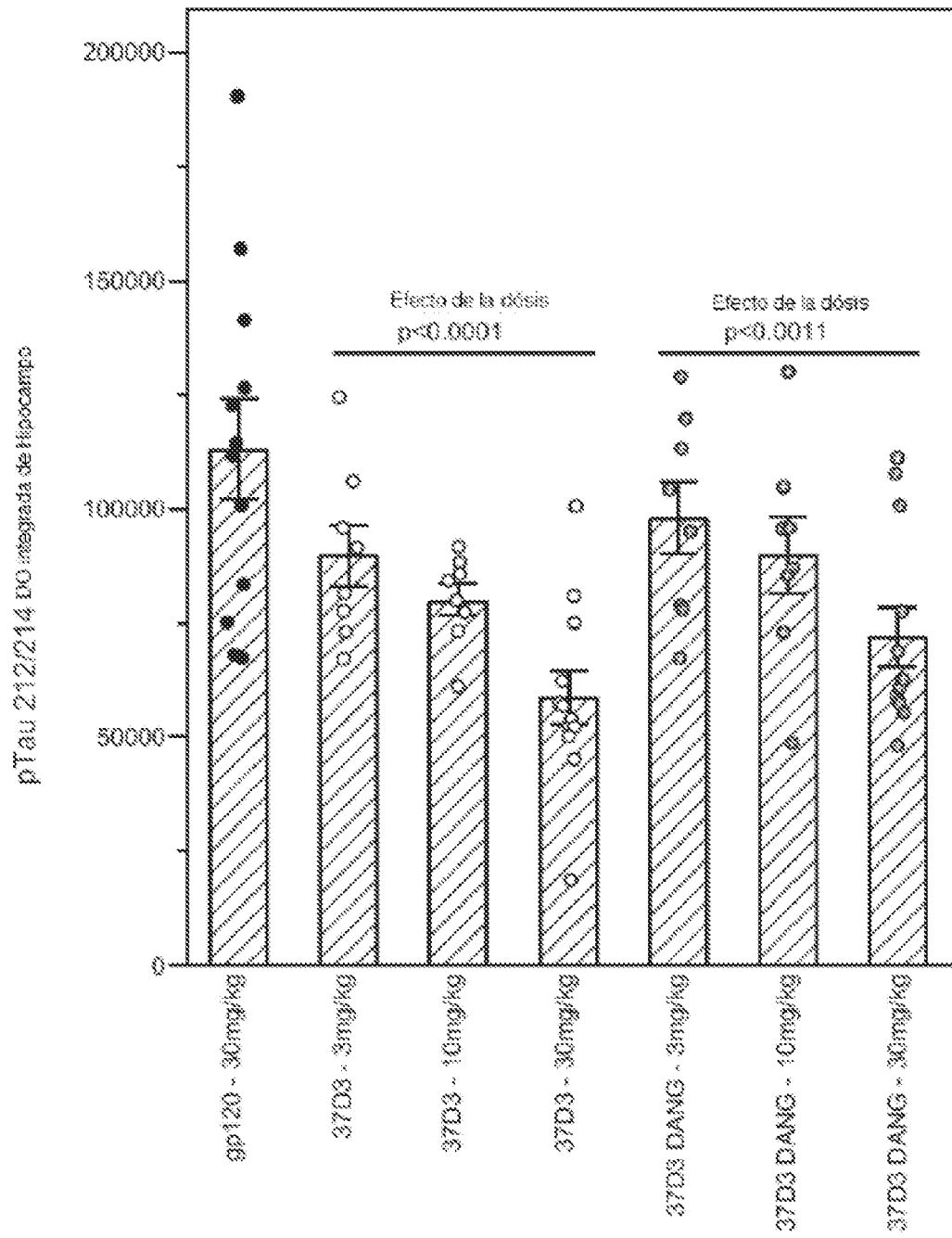
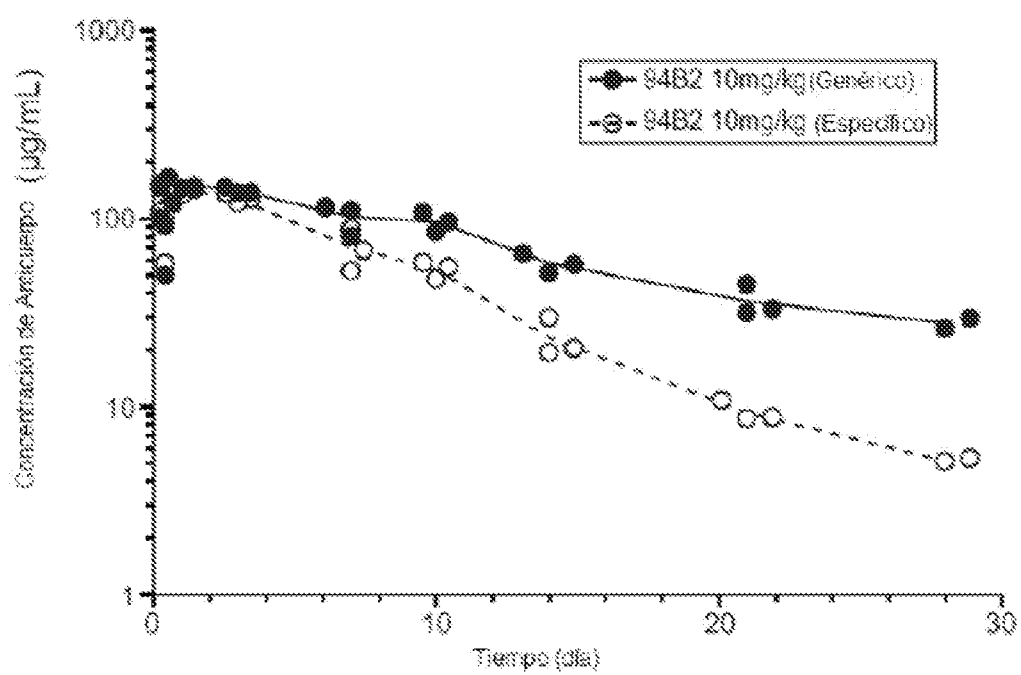
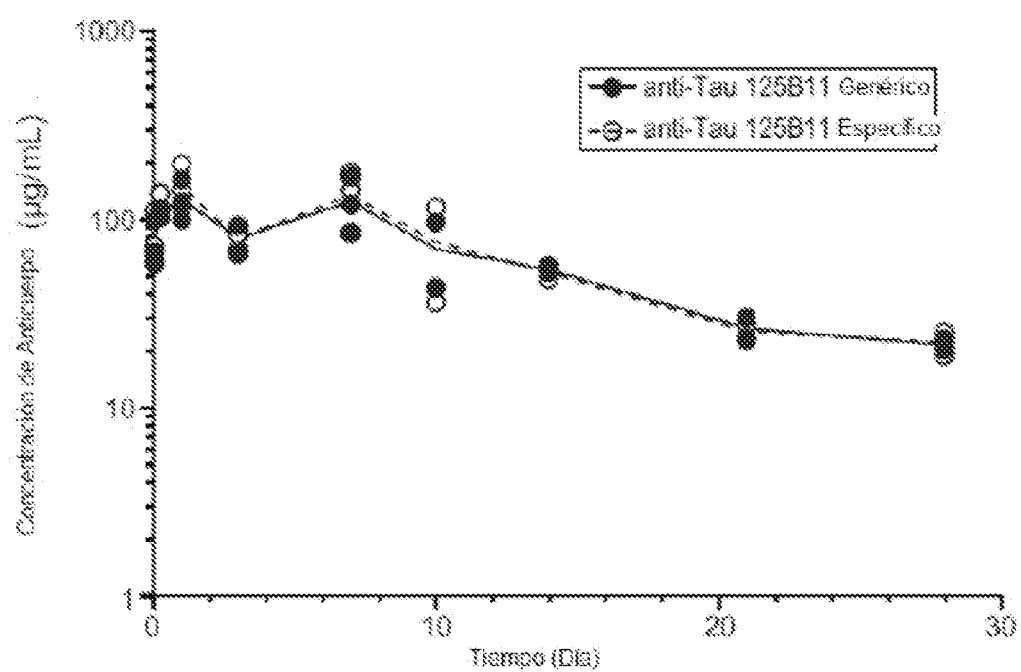


FIG. 14

Posición 2 de Taa natural		Epítipo 37D3 (2-24)		
		↓		
PRO364486.HU	1	MHHHHHHH	GENLYFOGSAEPRQEFVEMEDHAGTYCLGDRKDKCGYTMHQDQ 50	
PRO378546.CYNO	1	MHHHHHHH	GENLYFOGSAEPRQEFVEMEDHAGTYCLGDRKDKCGYTMHQDQ 50	
PRO364486.HU	51	EGD	TDACGLKESPLQTPTEEDGSEEEFCSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAP 100	
PRO378546.CYNO	51	EGD	TDACGLKESPLQTPTEEDGSEEEFCSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAP 100	
PRO364486.HU	101	GKQAAAQPE	TEIPECTTAAEAGIGDTPFSLDEDEAAGHVTOARMVSKSKDGT 150	
PRO378546.CYNO	101	GEQAAAQPE	TEIPECTTAAEAGIGDTPFSLDEDEAAGHVTOARMVSKSKDGT 150	
PRO364486.HU	151	GSDDKKAKG	ADCKTKKIATPRCAAPPQCKGQANATRIIPAKTTPAPKTPPSS 200	
PRO378546.CYNO	151	GSDDKKAKG	ADCKTKKIATPRCAAPPQCKGQANATRIIPAKTTPAPKTPPSS 200	
PRO364486.HU	201	GEPPKSGDRSGYSS	PGSPGTFGSRSTRPSLFTPEFTREPKKVAVVVTPPKS 250	
PRO378546.CYNO	201	GEPPKSGDRSGYSS	PGSPGTFGSRSTRPSLFTPEFTREPKKVAVVVTPPKS 250	
PRO364486.HU	251	PSSAKSRLO	TAPVPMPLKKNVKS	KIGSTENLKEQPGGKVQIINKKLDLS 300
PRO378546.CYNO	251	PSSAKSRLO	TAPVPMPLKKNVKS	KIGSTENLKEQPGGKVQIINKKLDLS 300
PRO364486.HU	301	NVQSKCCSKDNI	KHVPCCGSVQIVYKFPVDLSKVT	SKCCSLGNIHHKPGCG 350
PRO378546.CYNO	301	NVQSKCCSKDNI	KHVPCCGSVQIVYKFPVDLSKVT	SKCCSLGNIHHKPGCG 350
PRO364486.HU	351	QVEVKSEKLD	FKDRVQSKIGSLDNITHEVPGCGNKKIETHKLTFR	ENAKAK 400
PRO378546.CYNO	351	QVEVKSEKLD	FKDRVQSKIGSLDNITHEVPGCGNKKIETHKLTFR	ENAKAK 400
PRO364486.HU	401	TDHGAEIVYKSP	VVSGDTPSRHLSNVVSTG	SIDMVDSFQLATLADEVSA 450
PRO378546.CYNO	401	TDHGAEIVYKSP	VVSGDTPSRHLSNVVSTG	SIDMVDSFQLATLADEVSA 450
PRO364486.HU	451	LAKQGL	456	SEC ID NO: 1
PRO378546.CYNO	451	LAKQGL	456	SEC ID NO: 3

FIG. 15

**FIG. 16****FIG. 17**

91

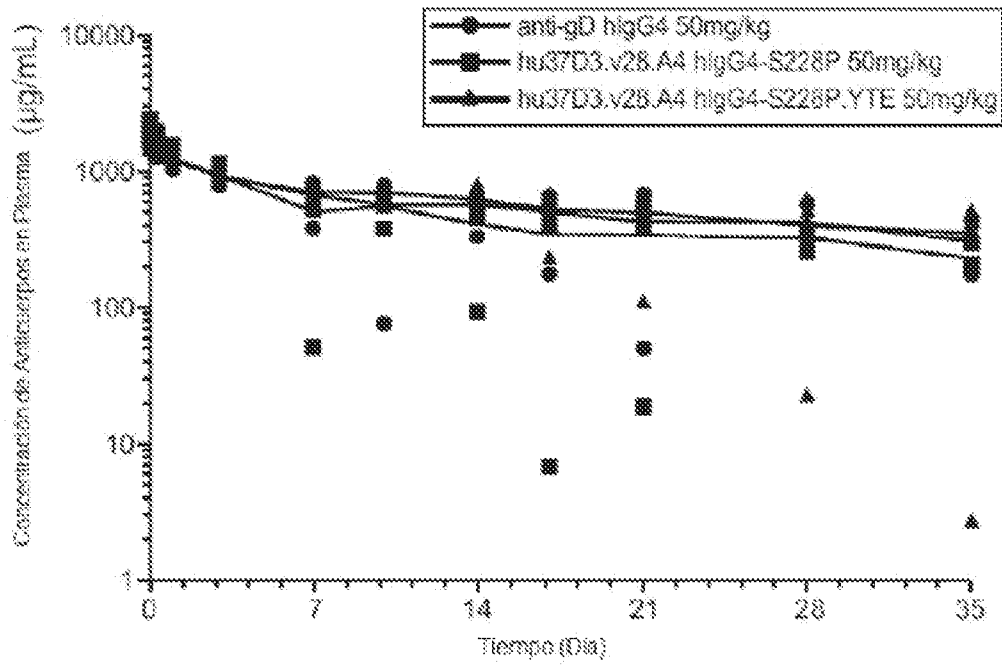


FIG. 19A

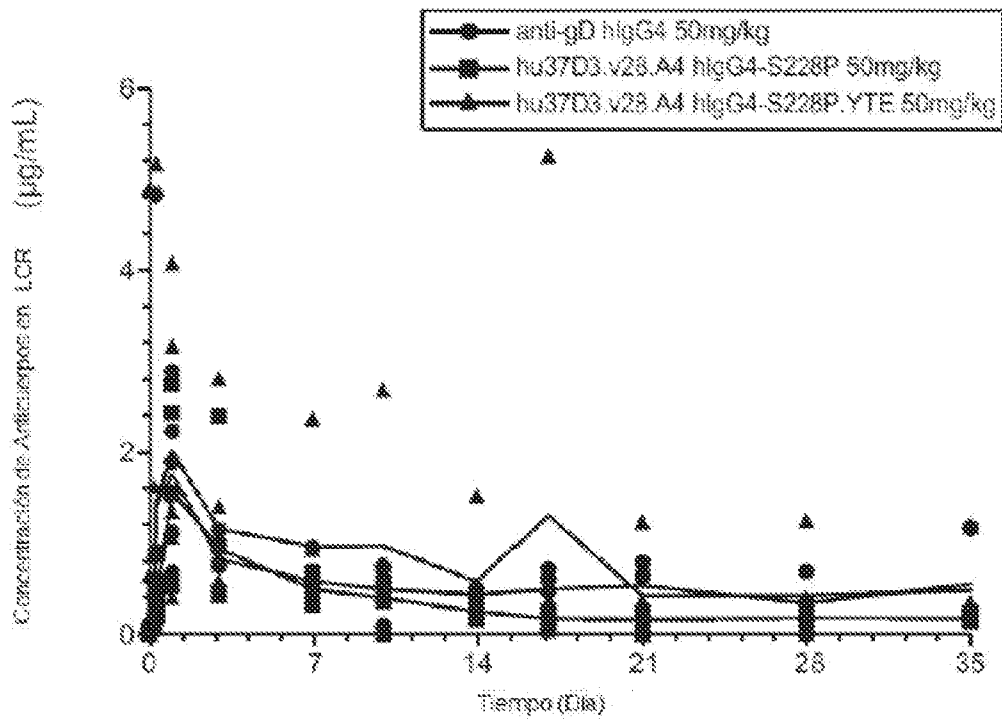


FIG. 19B

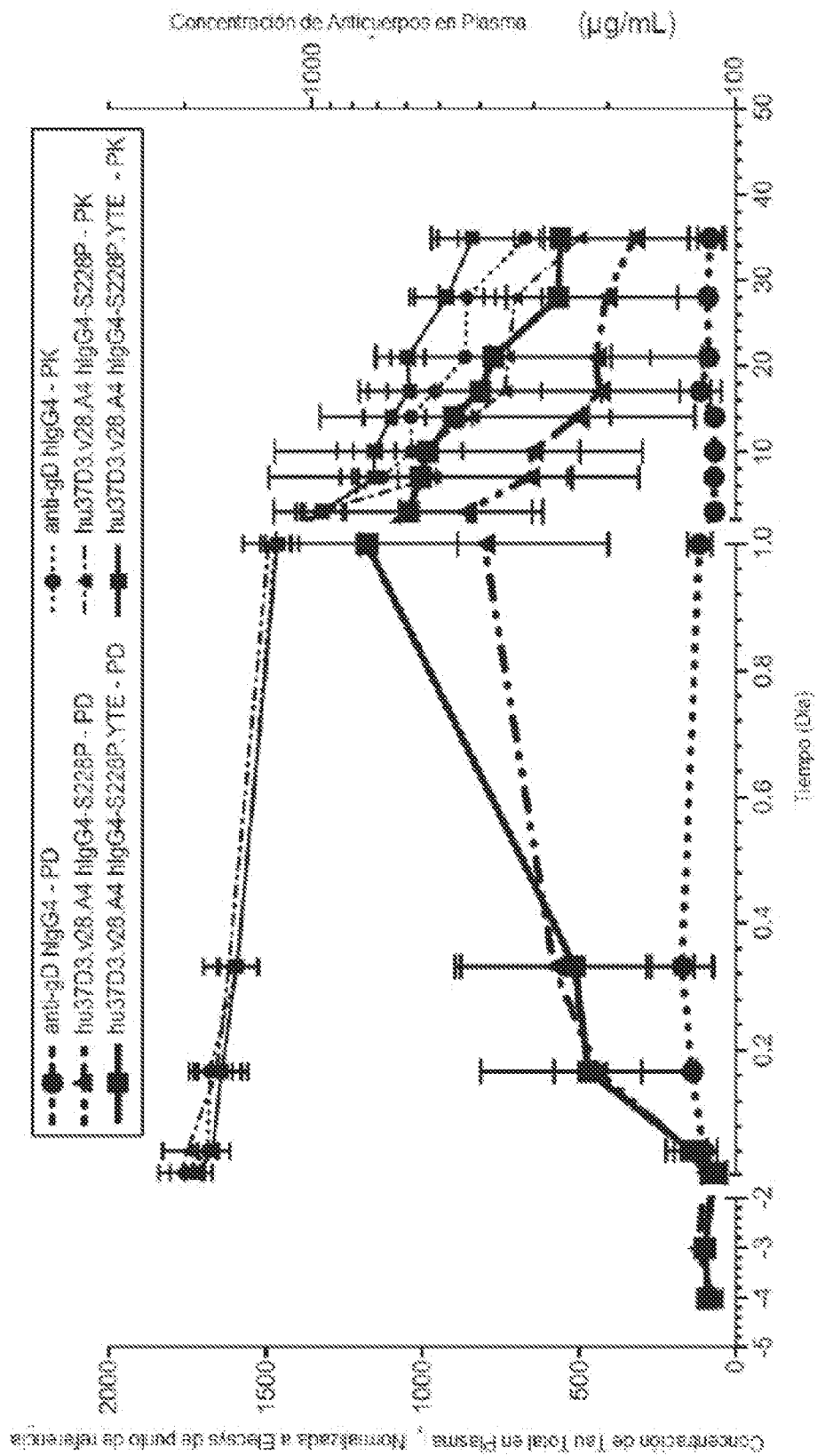


FIG. 20

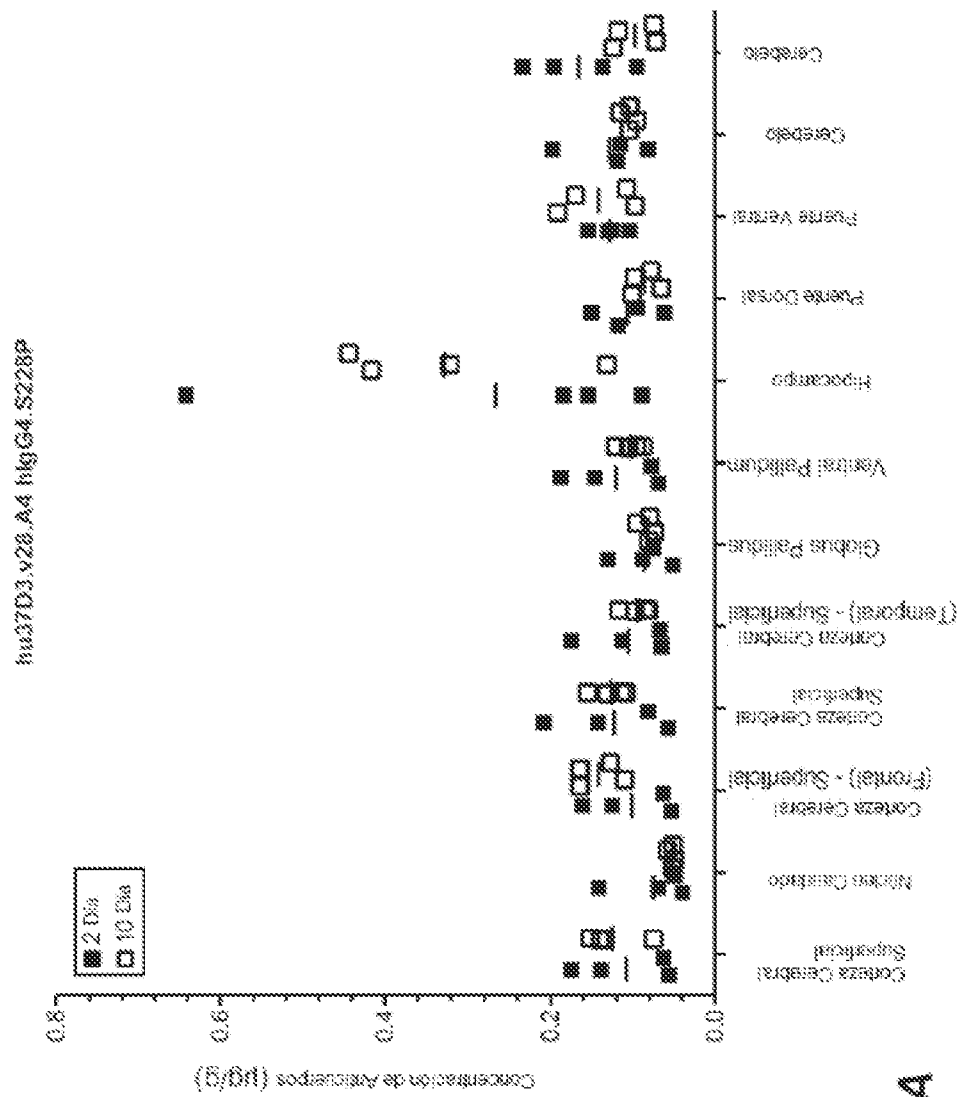


FIG. 21A

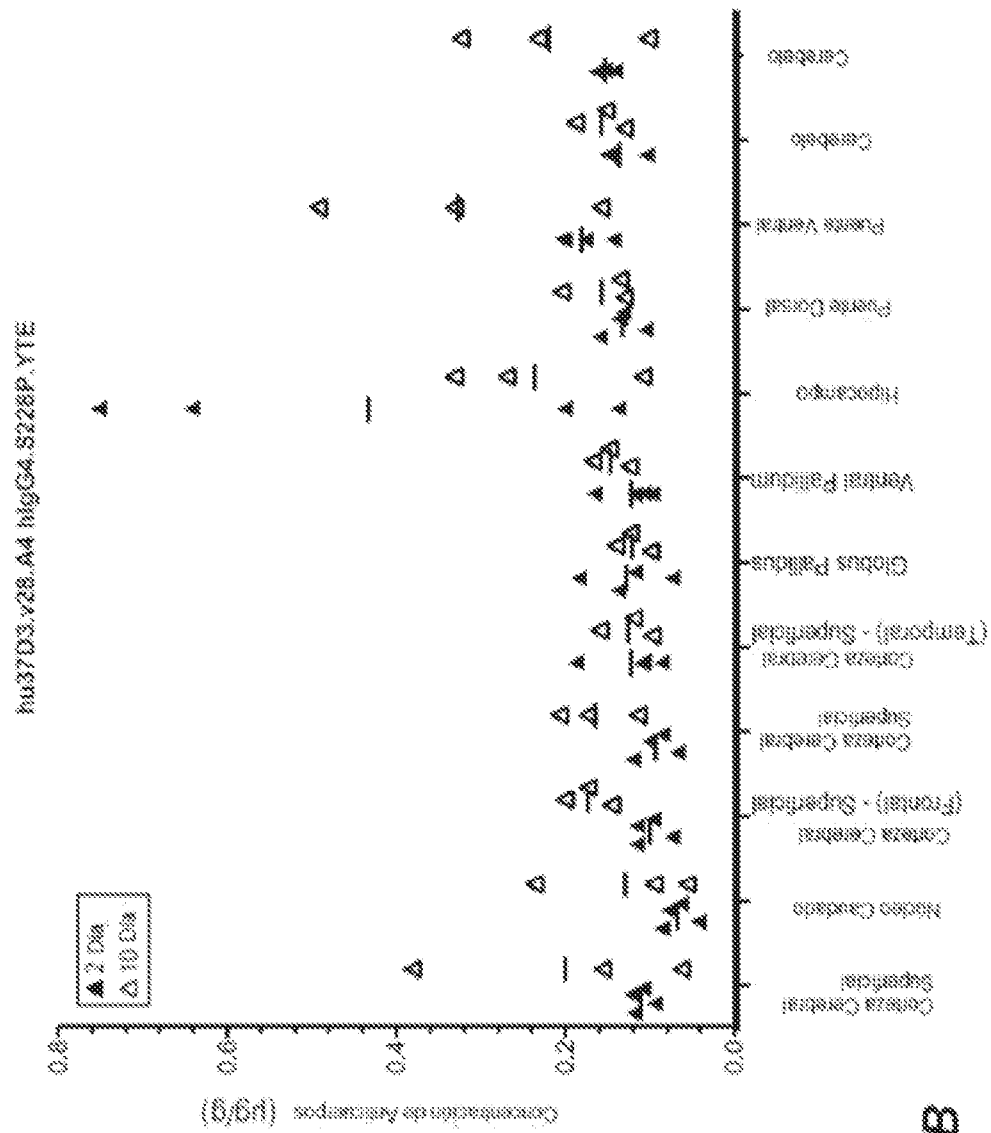
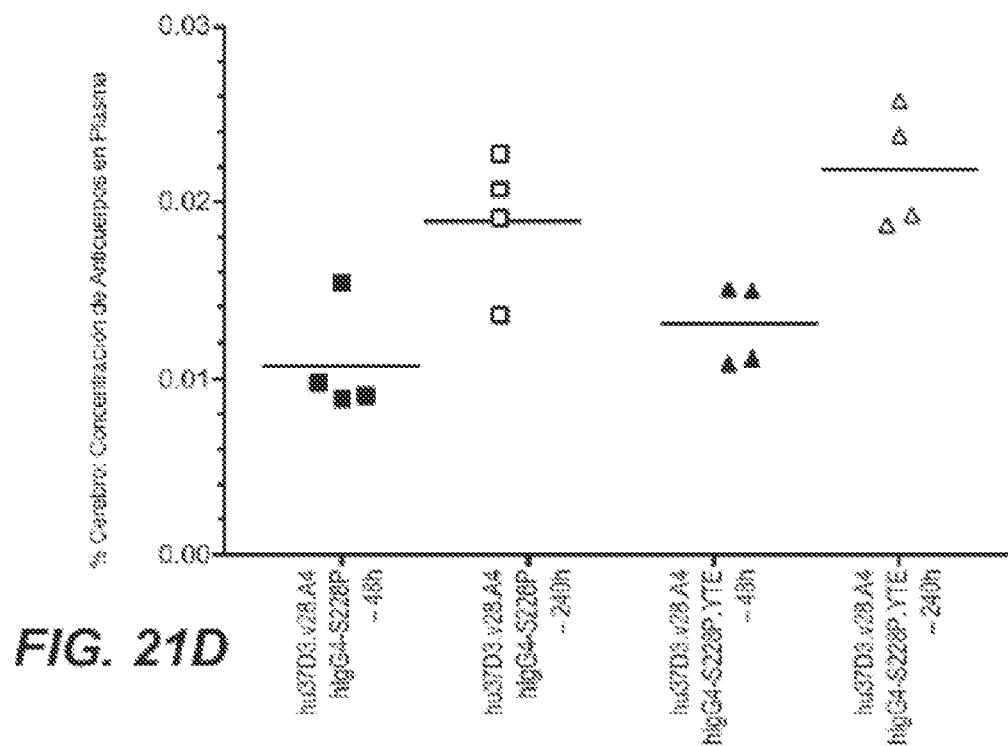
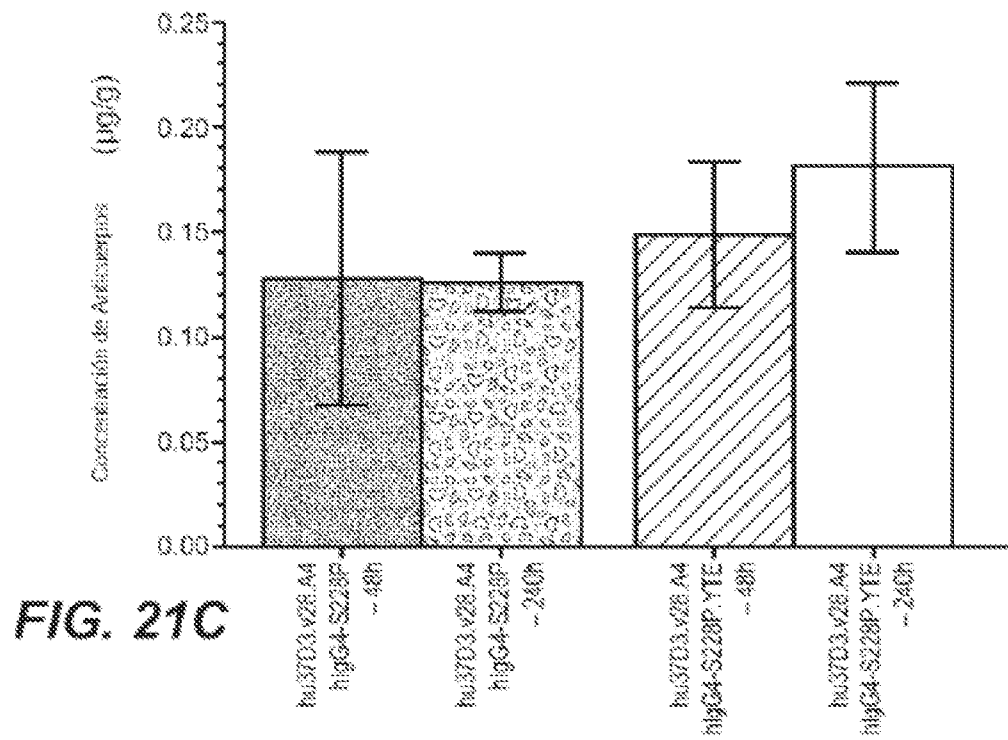


FIG. 21B



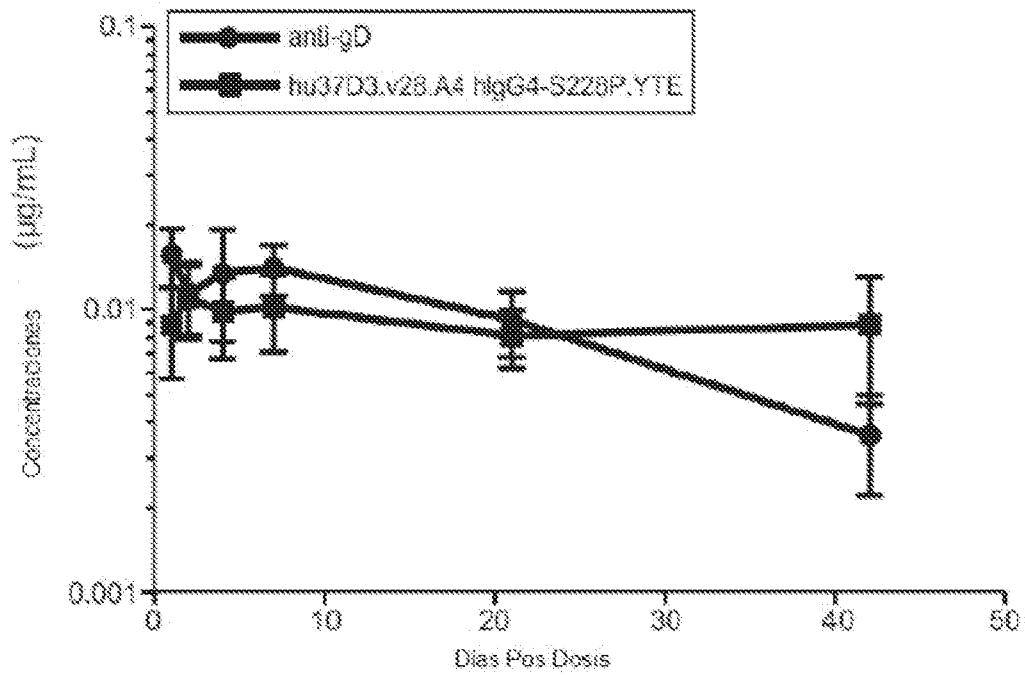


FIG. 22A

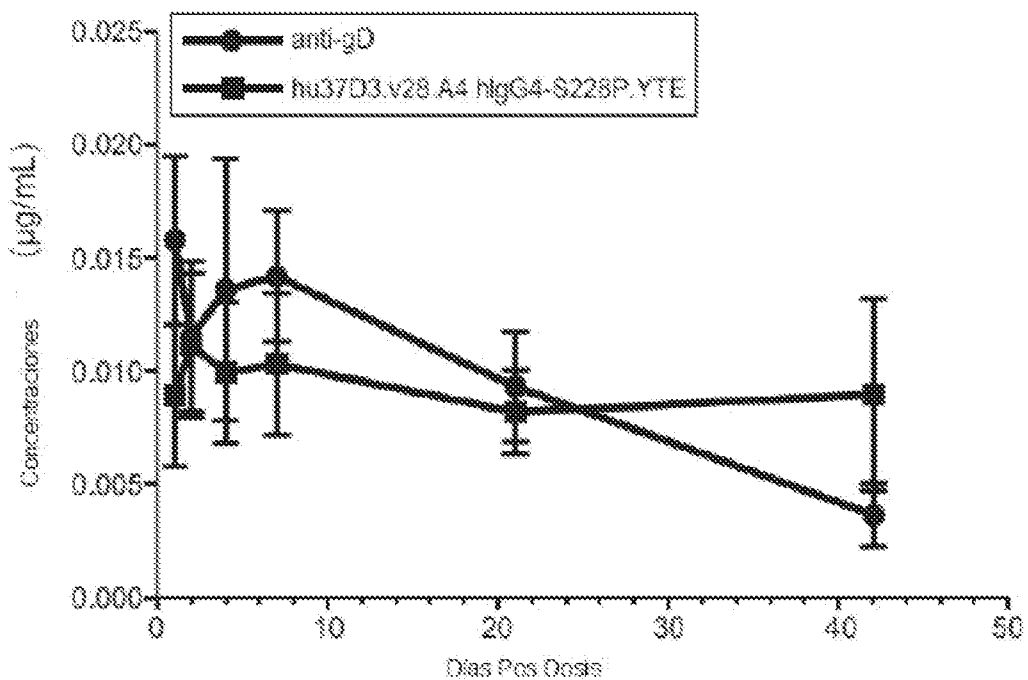


FIG. 22B

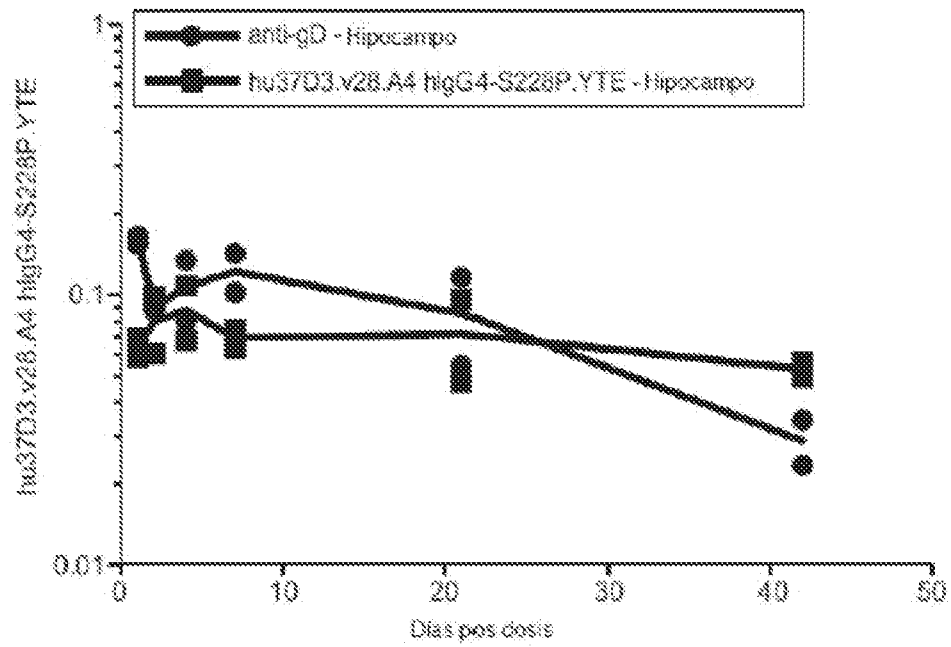


FIG. 23A

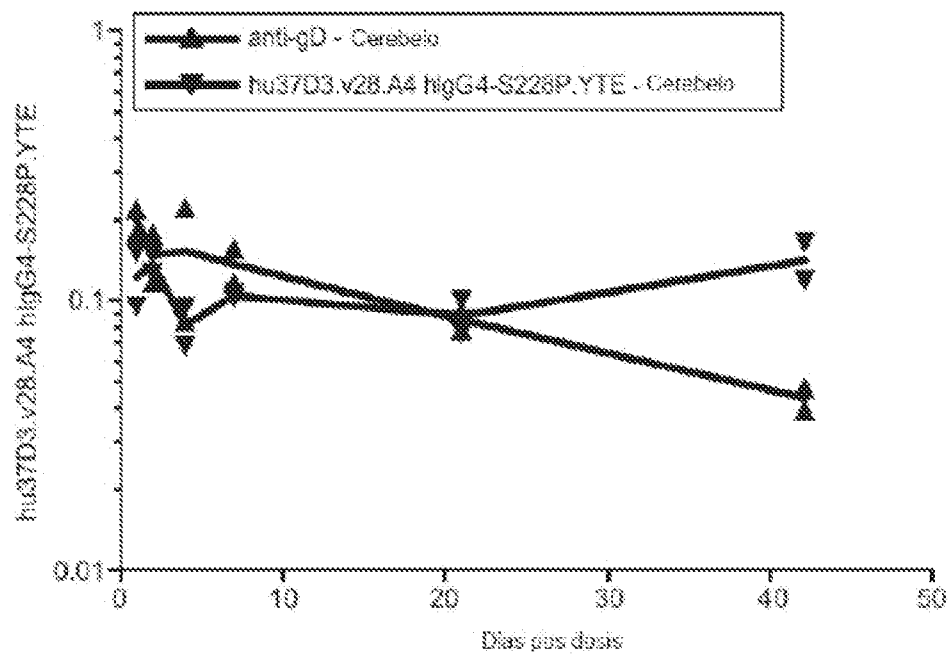


FIG. 23B

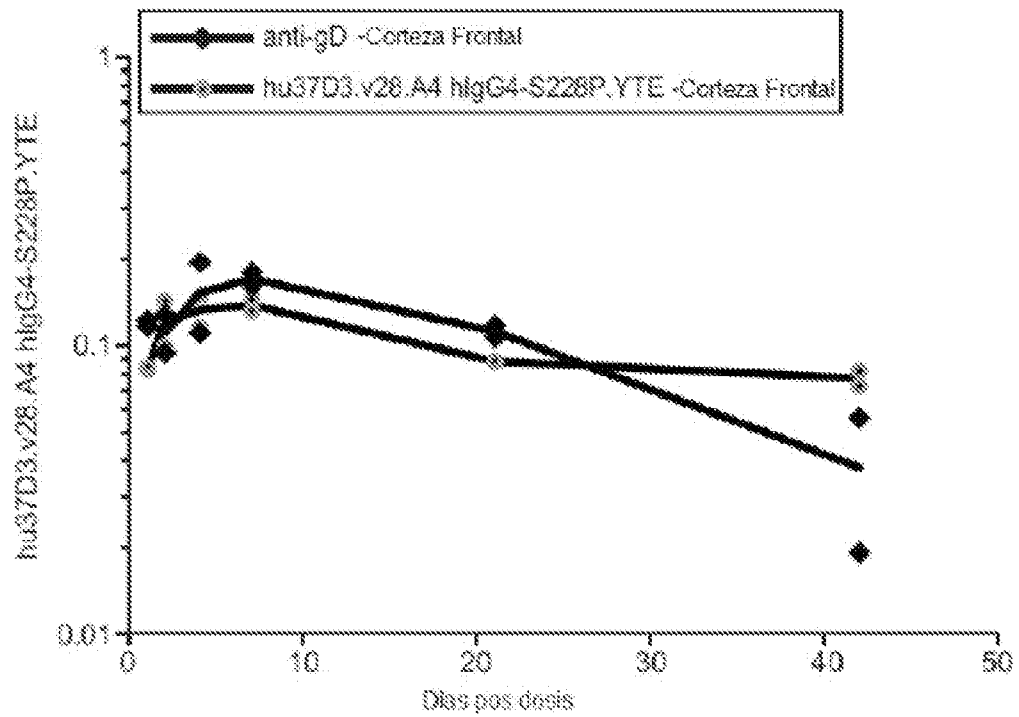


FIG. 23C

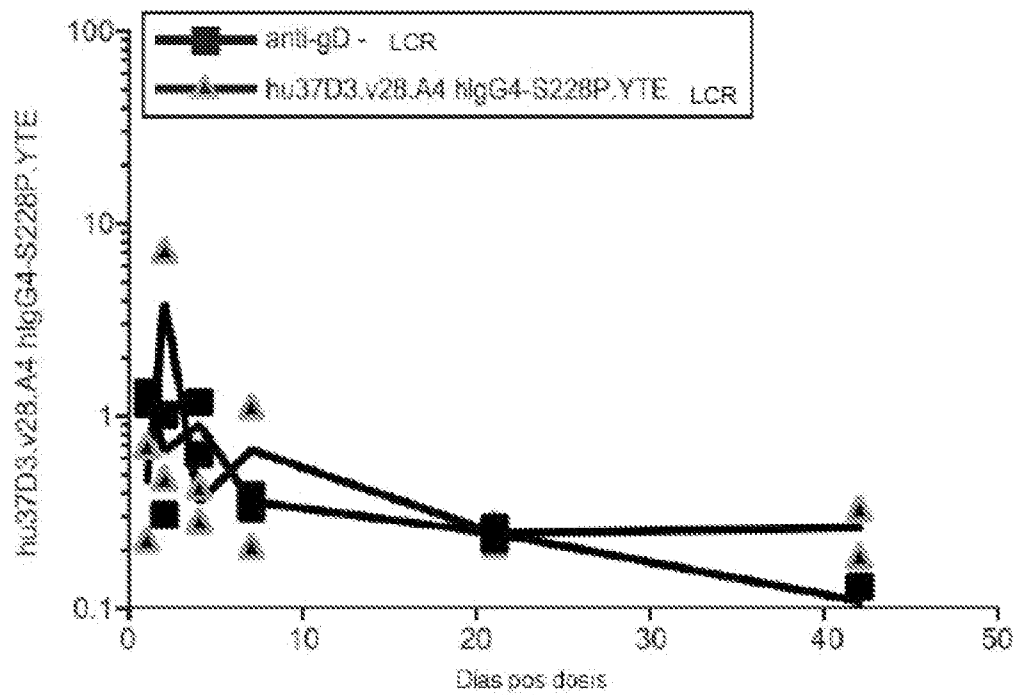


FIG. 23D

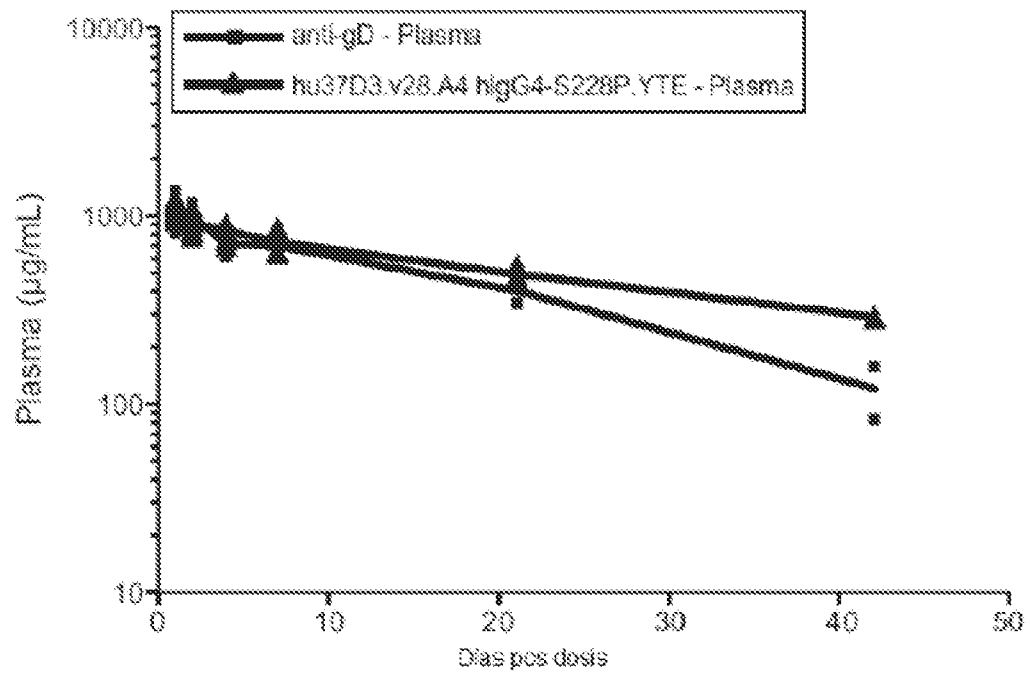


FIG. 23E

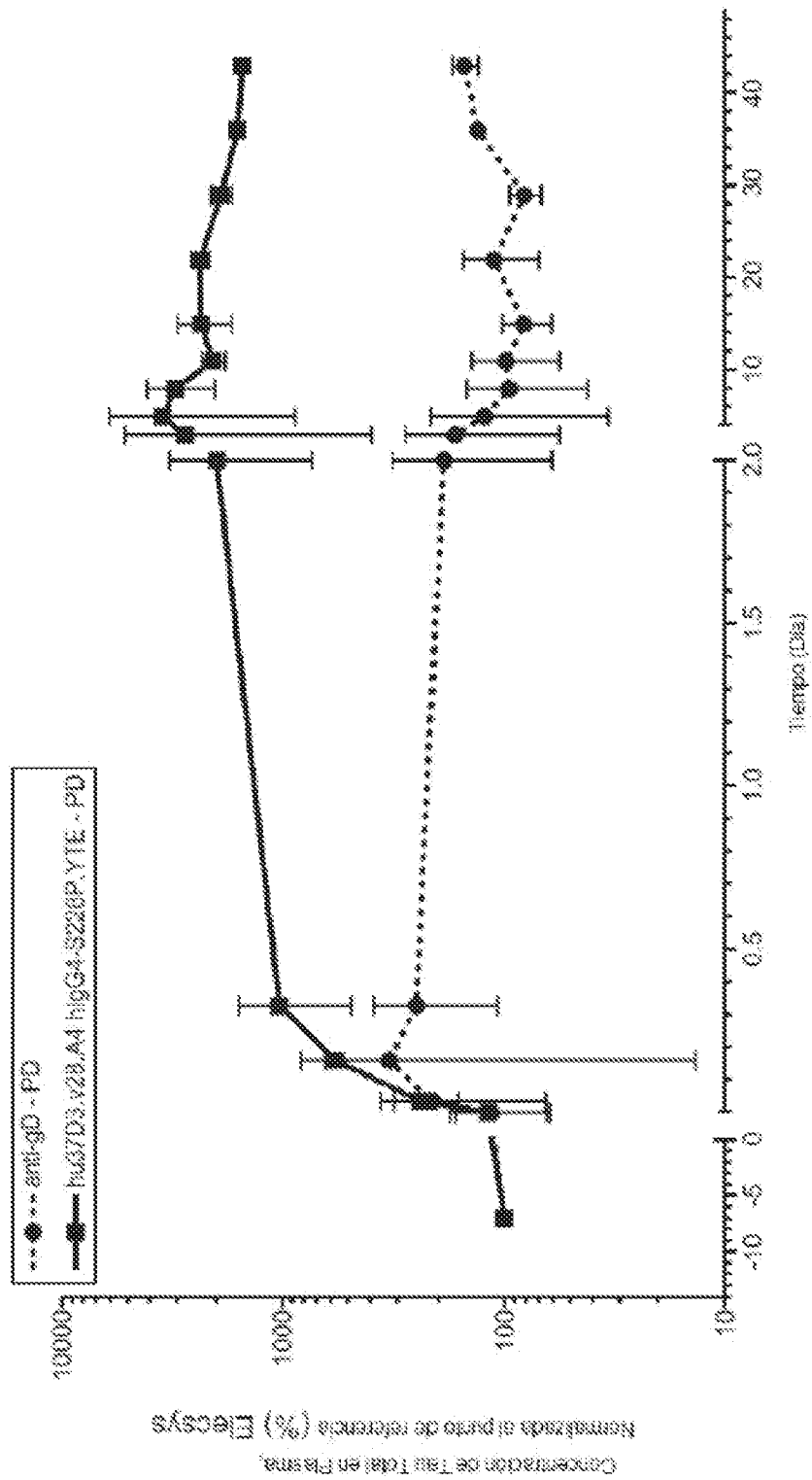


FIG. 24A

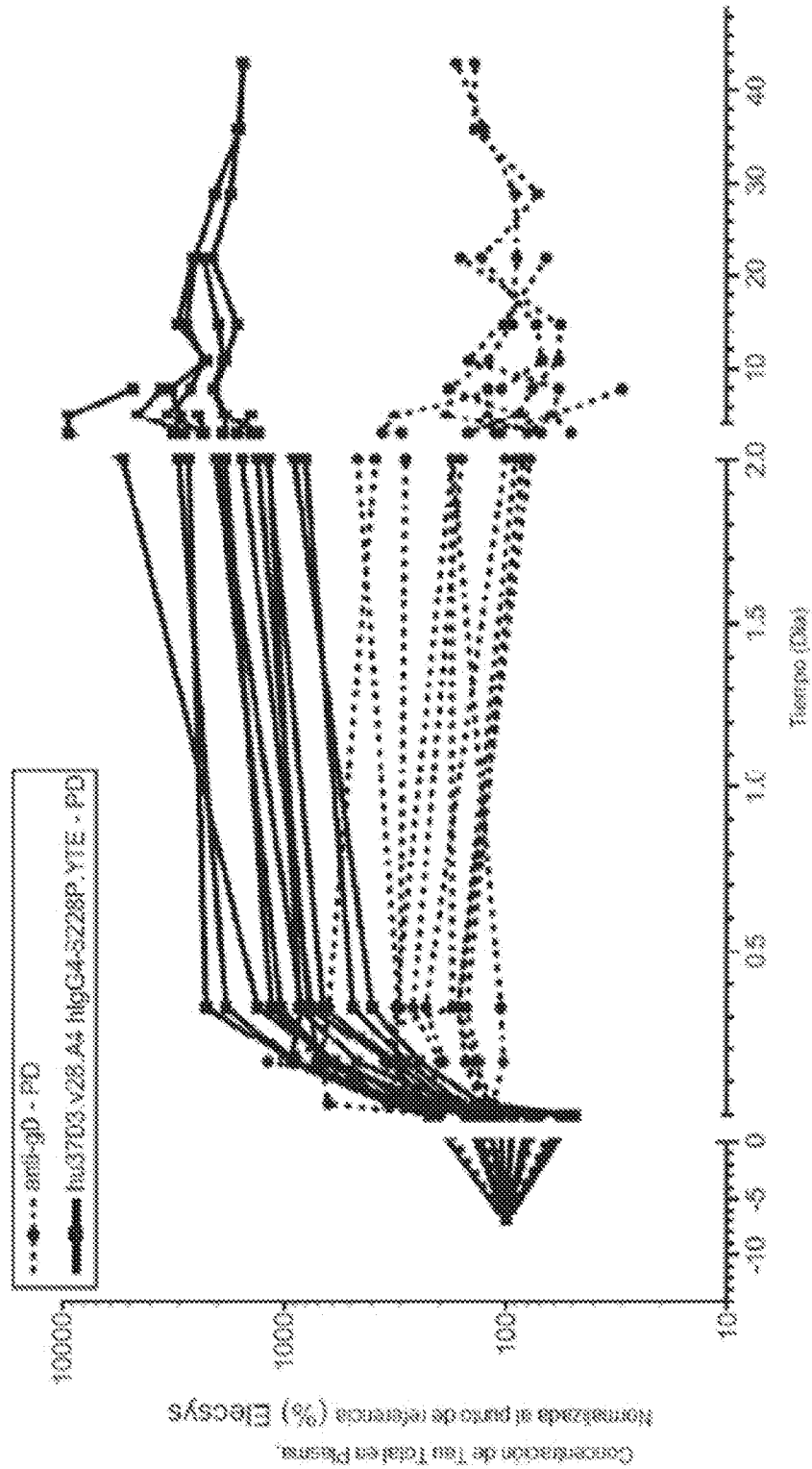


FIG. 24B

Región variable de cadena ligera

Número Kabat	CDR L1 - Chothia																														CDR L1 - Kontakt												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37						
hu37D3.v28.A4.hlgG4.YTE	D	D	V	L	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L		
hu37D3.v76.hlgG1	D	D	L	L	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L		
hu37D3.v76.hlgG4.YTE	D	D	L	L	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	P	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L		
hu37D3.v83.hlgG1	D	D	L	L	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	D	D	L	L	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	
hu37D3.v83.hlgG1	E	D	L	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	C	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	E	D	L	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	C	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	H	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	
Número Kabat	CDR L2 - Chothia																														CDR L2 - Kontakt												
	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
hu37D3.v28.A4.hlgG4.YTE	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v76.hlgG1	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v76.hlgG4.YTE	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v83.hlgG1	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v83.hlgG1	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	Q	K	P	Q	Q	S	P	Q	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E
Número Kabat	CDR L3 - Chothia																														CDR L3 - Kontakt												
	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	SEC	ID NO:													
hu37D3.v28.A4.hlgG4.YTE	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 341													
hu37D3.v76.hlgG1	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 604													
hu37D3.v76.hlgG4.YTE	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 604													
hu37D3.v83.hlgG1	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 615													
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 615													
hu37D3.v83.hlgG1	E	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 620													
hu37D3.v83.hlgG4.YTE	E	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	T	L	V	P	W	T	F	Q	Q	Q	T	K	V	E	I	K	SEC	ID NO: 620													

FIG. 25A

Región variable de cadena pesada

Número Kabat	CDR H1 - Contacto																																									
	CDR H1 - Chothia																				CDR H1 - Kabat																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hu3TD3.v28.A4.hlgG4.YTE	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v76.hlgG1	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v76.hlgG4.YTE	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v83.hlgG1	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v83.hlgG1	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	2	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	L	L	P	R	S	Y	G	R	S	W	Y	R	Q	A	P	G	
Número Kabat	CDR H2 - Contacto																																									
	CDR H2 - Chothia																				CDR H2 - Kabat																					
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
hu3TD3.v28.A4.hlgG4.YTE	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v76.hlgG1	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v76.hlgG4.YTE	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v83.hlgG1	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v83.hlgG1	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	X	G	L	E	W	V	A	T	I	N	S	G	G	T	Y	T	Y	T	P	D	S	V	K	G	R	P	T	I	S	R	D	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	N	N
Número Kabat	CDR H3 - Contacto																																									
	CDR H3 - Chothia																				CDR H3 - Kabat																					
	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	SEC ID NO:	340							
hu3TD3.v28.A4.hlgG4.YTE	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	603						
hu3TD3.v76.hlgG1	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	603						
hu3TD3.v76.hlgG4.YTE	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	614						
hu3TD3.v83.hlgG1	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	614						
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	619						
hu3TD3.v83.hlgG1	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	619						
hu3TD3.v83.hlgG4.YTE	S	L	R	A	R	D	T	A	V	I	Y	C	A	N	S	T	S	G	A	N	D	Y	W	Q	Q	Q	Q	T	L	V	T	Y	S	S	SEC ID NO:	619						

Fig. 25B

