



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 991 587**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2016** PCT/US2016/035409

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** WO16196726

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016** E 16728559 (2)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** EP 3303386

⑮ Título: **Anticuerpos anti-Tau y métodos de uso**

⑯ Prioridad:

**05.06.2015 US 201562171693 P**

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

**03.12.2024**

⑯ Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US y**  
**AC IMMUNE SA (50.0%)**

⑯ Inventor/es:

**ADOLFSSON, OSKAR;**  
**AYALON, GAI;**  
**DI CARA, DANIELLE MARIE y**  
**HOTZEL, ISIDRO**

⑯ Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 991 587 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 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Tau y a usos de los mismos.

## Antecedentes

10 Los ovillos neurofibrilares y los hilos neuropilares (NT, por sus siglas en inglés) son las principales características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los NT se componen de la proteína Tau asociada a microtúbulos que ha experimentado modificaciones postraduccionales, incluyendo la fosforilación, y se desarrollan por agregación de confórmeros de Tau hiperfosforilados. La EA comparte esta patología con muchas tauopatías 15 neurodegenerativas, en particular con determinados tipos de demencia frontotemporal (DFT). La proteína Tau parece ser uno de los principales responsables del deterioro cognitivo en la EA y tauopatías neurodegenerativas relacionadas.

20 Los enfoques terapéuticos dirigidos a la proteína Tau son escasos y comprenden principalmente inhibidores de las cinasas que se cree que aumentan la fosforilación de Tau a niveles patológicos, y compuestos que bloquean la agregación citoplasmática de la proteína Tau hiperfosforilada. Estos enfoques adolecen de diversos inconvenientes de especificidad y eficacia. Existe la necesidad de agentes terapéuticos adicionales que se dirijan a los confórmeros de proteínas patológicos que se sabe o se presume que provocan trastornos neurodegenerativos.

25 El documento WO2013/007839 A1 describe anticuerpos para la detección de Tau agregada. El documento WO2014/200921 A1 describe métodos de tratamiento de una tauopatía, que implican administrar un anticuerpo anti-Tau. El documento WO2014/059442 A2 describe anticuerpos que reconocen específicamente formas oligoméricas de Tau. El documento WO2014/150877 A2 describe anticuerpos anti-Tau, tales como anticuerpos que se unen a un epítopo fosforilado en la proteína Tau humana con alta especificidad y/o afinidad.

30 **Sumario**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada, en donde el anticuerpo comprende:

35 HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 342; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 344; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 345; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 346; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347.  
40

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende:

- 45 a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 340;  
b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 341; o  
c) un VH como en (a) y una VL como en (b).

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 340 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 341.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349.

- anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349.
- 5 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG1 o uno IgG4. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG4. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo comprende las mutaciones M252Y, S254T y T256E. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo puede contener una mutación S228P. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo puede comprender las mutaciones S228P, M252Y, S254T y T256E. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 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 el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG4 que comprenda las mutaciones S228P, M252Y, S254T y T256E, y que carezca de la lisina del extremo C (des-K) de la región constante de cadena pesada. La lisina C-terminal de la región constante de cadena pesada puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el anticuerpo de manera que la lisina C-terminal no esté codificada.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a cada una de entre Tau monomérica, Tau fosforilada, Tau no fosforilada y Tau oligomérica con una  $K_D$  inferior a 100 nM, inferior a 75 nM o inferior a 50 nM. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a Tau de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 4).
- 15 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado codifica un anticuerpo de la presente invención. En algunas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora, en donde la célula hospedadora comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, se proporciona un método de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo.
- 20 En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo aislado de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención puede estar presente como parte de un inmunoconjunto que comprenda el anticuerpo aislado y un agente terapéutico. El anticuerpo de la presente invención puede estar presente como parte de un anticuerpo marcado, que comprende el anticuerpo y un marcador detectable.
- 30 En algunas realizaciones, se proporciona un método de detección de ovillos neurofibriliares, hilos neuropilares o neuritis distrófica, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de cerebro, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de sangre.
- 35 El anticuerpo aislado descrito en el presente documento puede usarse como medicamento. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado de la presente invención se proporciona 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 Enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibriliares, demencia con granos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibriliares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, degeneración pálido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos únicamente, parkinsonismo postencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer o la parálisis supranuclear progresiva.
- 40 En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo aislado de la presente invención para su uso en la retención o el aumento de la capacidad de memoria cognitiva o la ralentización de la pérdida de memoria en un individuo.
- 45 En algunas realizaciones, se proporciona un método de detección de ovillos neurofibriliares, hilos neuropilares o neuritis distrófica, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de cerebro, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de sangre.
- 50 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, un uso puede comprender administrar el anticuerpo en combinación con al menos una terapia adicional. Los ejemplos no limitantes de terapias adicionales incluyen fármacos neurológicos, corticoesteroides, antibióticos, agentes antivíricos y otros agentes terapéuticos.
- 55 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, un uso puede comprender administrar el anticuerpo en combinación con al menos una terapia adicional. Los ejemplos no limitantes de terapias adicionales incluyen fármacos neurológicos, corticoesteroides, antibióticos, agentes antivíricos y otros agentes terapéuticos.
- 60 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, un uso puede comprender administrar el anticuerpo en combinación con al menos una terapia adicional. Los ejemplos no limitantes de terapias adicionales incluyen fármacos neurológicos, corticoesteroides, antibióticos, agentes antivíricos y otros agentes terapéuticos.
- 65 En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, un uso puede comprender administrar el anticuerpo en combinación con al menos una terapia adicional. Los ejemplos no limitantes de terapias adicionales incluyen fármacos neurológicos, corticoesteroides, antibióticos, agentes antivíricos y otros agentes terapéuticos.

Dichos otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, otros anticuerpos anti-Tau, inhibidores de Tau, anticuerpos contra beta-amiloide, inhibidores de la agregación beta-amiloide, anticuerpos contra la beta-secretasa 1 ("BACE1") e inhibidores de la beta-secretasa 1.

5 **Breve descripción de las figuras**

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

10 Figura 2A-E. La unión de anticuerpos a Tau oligomérica se evaluó usando un ELISA de captura de oligo y monoTau. Los resultados se expresan en densidades ópticas (D.O.).

15 Figura 3. Los tres anticuerpos contra panTau sometidos a ensayo muestran unión a Tau soluble en lisados de cerebro de la enfermedad de Alzheimer (EA) y de donantes de control emparejados usando un ensayo de transferencia Western (WB, por sus siglas en inglés). Se sometieron a SDS-PAGE extractos de proteínas de lisados de cerebro de EA y de control, y seis isoformas de Tau humana recombinante, y las membranas se transfirieron con tres anticuerpos contra panTau (37D3-H9, 94B2-C1 y 125B11-H3). Los carriles con muestras de EA se rotulan como AD18, AD24 y AD27, y los carriles con muestras de control se rotulan como C25 y C21. Los carriles ejecutados con seis isoformas de Tau humana recombinante se rotulan como escalera de hTau.

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

25 Figura 5. Sensogramas que muestran la unión de 37D3-H9 como Fab (panel izquierdo) y como 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 el tiempo (unidades = segundos). El eje y indica las unidades de resonancia (UR).

30 Figura 6. Sensogramas superpuestos que muestran la unión de las 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 que también se muestra en esta figura. El eje x indica el tiempo (unidades = segundos). El eje y indica las unidades de resonancia (UR).

35 Figura 7. Unión de hu37D3-H9.v5 y hu37D3-H9.v5 N28D a Tau monomérica individualmente (el panel izquierdo muestra hu37D3-H9.v5 y el panel central muestra hu37D3-H9.v5 N28D) y mezclados en una relación 1:1 (panel derecho). El eje x indica el tiempo (unidades = segundos). El eje y indica las unidades de resonancia (UR).

Figura 8A-D. Afinidad, índice de estabilidad y secuencias de las noventa variantes de 37D3-H9 cribadas para determinar su potencial de estabilidad mejorada. Por motivos de claridad, los valores obtenidos con un anticuerpo de control no estresado (hlgG1 hu37D3-H9.v5) ejecutado al principio, 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 de 37D3-H9 que muestra las posiciones de los restos 28 a 33 (motivo NGNTYF) de la cadena ligera y las posiciones relativas de los restos 28 y 33. Nótese que el resto 33, mutado en hu37D3.v28.A4 a Leu, no está cerca del resto Asn-28 inestable. La línea discontinua muestra un enlace de hidrógeno entre los restos Asn-28 y Tyr-32. Figura generada usando el paquete de software MOE (Chemical Computing Group).

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

40 La Figura 11 muestra la farmacocinética de hlgG4-S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en macacos cangrejeros después de una única inyección IV en embolada a una dosis de 1 mg/kg.

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

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

55 Figura 14. Niveles de pTau212/214 en el hipocampo de ratones a los que se administró IgG2a TS 37D3-H9 anti-tau o IgG2 DANG 37D3-H9 anti-tau.

Figura 15. Comparación de secuencias de Tau humana y de macaco cangrejero (CYNO, en las figuras). Se indica el epítopo para el anticuerpo 37D3-H9.

60 La Figura 16 muestra la farmacocinética del anticuerpo anti-Tau 94B2-C1 en ratones después de una única inyección intravenosa o intraperitoneal de 10 mg/kg.

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

65 La Figura 18 muestra una alineación 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-B muestra la concentración de anticuerpos en plasma (A) y en LCR (B) en macacos cangrejeros después 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 anticuerpos en plasma en macacos cangrejeros después de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

5 Las Figuras 21A-D muestran la concentración de anticuerpos en diversas regiones del cerebro de macaco cangrejero 2 días y 10 días después de una única inyección IV de hlgG4-S228P hu37D3.v28.A4 (A) y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 (B) a 50 mg/kg; concentración de anticuerpos promedio en cerebro (C); % de concentración de anticuerpos en cerebro:plasma (D).

10 Las Figuras 22A-B muestran la concentración del anticuerpo en cerebro de macaco cangrejero en diversos puntos temporales después de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg, representada en escala logarítmica (A) y lineal (B).

15 Las Figuras 23A-E muestran la concentración del anticuerpo en el hipocampo (A), cerebelo (B), corteza frontal (C), LCR (D) y plasma (E) de macacos cangrejeros en diversos puntos temporales después de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

Las Figuras 24A-B muestran la concentración de Tau total en plasma promedio (A) e individual (B) a lo largo del tiempo en macacos cangrejeros después de una única inyección IV del anticuerpo indicado a 50 mg/kg.

### 15 **Descripción detallada de la invención**

#### **I. Definiciones**

20 Un "marco aceptor humano", a efectos del presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, como se define a continuación. Un marco aceptor humano "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo o puede contener cambios en 25 la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de 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, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia del marco de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia del marco de consenso humano.

30 "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique otra cosa, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y puede representarse generalmente por su constante de disociación ( $K_D$ ). La afinidad 35 puede medirse mediante métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

40 Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés), en comparación con un anticuerpo precursor que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

45 Las expresiones "anticuerpo anti-Tau" y "un anticuerpo que se une a Tau" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a Tau con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico para el direccionamiento a Tau. En algunas realizaciones, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-Tau a una proteína distinta de Tau, no relacionada, es inferior a aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a Tau medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). En determinadas realizaciones, 50 un anticuerpo que se une a Tau tiene una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\leq 1\mu M$ ,  $\leq 100 nM$ ,  $\leq 10 nM$ ,  $\leq 1 nM$ ,  $\leq 0,1 nM$ ,  $\leq 0,01 nM$  o  $\leq 0,001 nM$  (por ejemplo,  $10^{-8} M$  o inferior, por ejemplo, de  $10^{-8} M$  a  $10^{-13} M$ , por ejemplo, de  $10^{-9} M$  a  $10^{-13} M$ ). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-Tau se une a un epítopo de Tau que está conservado entre Tau de diferentes especies. Las expresiones "anticuerpo anti-Tau" y "anticuerpo que se une a Tau", como se usan en el presente documento, se refieren a un anticuerpo que se une a Tau monomérica, Tau oligomérica y/o Tau fosforilada, a menos que se indique específicamente otra cosa. En algunas de dichas realizaciones, el anticuerpo anti-Tau se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada con afinidades comparables, tal 55 como con afinidades que no difieran 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 se denomina "anticuerpo contra pan-Tau".

60 El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

65 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos

lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

5 Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" 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 competencia en un 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un 50 % o más en un ensayo de competencia. En el presente documento se proporciona un ensayo de competencia de ejemplo.

10 El término anticuerpo "químérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena ligera y/o pesada deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

15 La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que tiene su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden subdividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente.

20 La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isotópicos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isotópicos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos que se divultan a continuación.

30 Las "funciones efectoras" se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

35 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

40 La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En algunas realizaciones, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226 o de Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique otra cosa en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o en la región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

50 "Marco" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La región FR de un dominio variable consiste generalmente en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

55 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

60 Las expresiones "célula hospedadora", "estirpe celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras", se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen a la célula primaria transformada y a la descendencia derivada de esta, independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser totalmente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, sino que puede contener mutaciones. En el presente documento se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica cribada o seleccionada en la célula transformada originariamente.

65 Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo

producido por un ser humano o una célula humana o que deriva de una fuente no humana, que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

- 5 La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6.<sup>a</sup> ed., W. H. Freeman y Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Adicionalmente, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).
- 10 15 Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana procede de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. En algunas realizaciones, para la VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, citado anteriormente. En algunas realizaciones, para la VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *et al.*, citado anteriormente.
- 20 25 30 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo químérico que comprende restos de aminoácido procedentes de HVR no humanas y restos de aminoácidos procedentes de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las 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 puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

- 35 La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a su secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucle hipervariables") y/o contienen los restos de contacto con el antígeno ("contactos de antígenos"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR de ejemplo del presente documento incluyen:

- 40 (a) bucles hipervariables que aparecen en los restos 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 aparecen en los restos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));  
 (c) contactos de antígenos que aparecen en los restos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y  
 (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los restos de aminoácido 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).

- 50 55 A menos que se indique otra cosa, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, los restos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente.

- 60 Un "inmunoconjungado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico.
- 65 55 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.
- 60 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica hasta una pureza superior al 95 % o 99 % como se determina mediante, por ejemplo, medios electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para una revisión de los métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).
- 65 65 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su

entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenido en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

- 5 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-Tau" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha una o más moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados y dicha una o más moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones en una célula hospedadora.
- 10 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades minoritarias. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopenos), 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 que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que han de usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulinas humanas, describiéndose en el presente documento dichos métodos y otros métodos de ejemplo para preparar anticuerpos monoclonales.
- 15 25 Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o un radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.
- 30 Los "anticuerpos nativos" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligera idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio ligero variable o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio constante ligero (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.
- 35 40 El término "prospecto" se usa para referirse 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 de combinación, las contraindicaciones y/o las advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.
- 45 50 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles públicamente, tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc. y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los EE.UU. (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el N.º de registro de derechos de autor de los EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., San Francisco Sur, California, o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.
- 55 60 65 En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede citarse, como alternativa, como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o

comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "Tau", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína Tau nativa derivada de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique otra cosa. El término abarca Tau "de longitud completa", Tau no procesada, así como cualquier forma de la proteína que sea el resultado de su procesamiento en la célula. El término también abarca variantes de origen natural de Tau, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes alélicas.

El término "pTau", como se usa en el presente documento, se refiere a Tau en la que un resto de serina, uno de treonina o uno de tirosina es fosforilado por una proteína cinasa mediante la adición de un grupo fosfato unido covalentemente. En algunas realizaciones, pTau se fosforila en un resto de serina o uno de treonina. En algunas realizaciones, pTau está fosforilada en Serina en la posición 409 y/o Serina en la posición 404. En algunas realizaciones, pTau está fosforilada en Serina en la posición 409.

Las expresiones "Tau soluble" o "proteína Tau soluble", como se usan en el presente documento, se refieren a proteínas que consiste en monómeros de proteína/péptido Tau totalmente solubilizados o en péptidos/proteínas similares a Tau, o en péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o en otros derivados de monómeros de péptidos/proteínas Tau y en oligómeros de proteína Tau. "Tau soluble" excluye en particular los ovillos neurofibrilares (NFT).

La expresión "Tau insoluble", como se usa en el presente documento, se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o de péptidos/proteínas similares a Tau, o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de mamíferos o humano más en particular en el cerebro, pero en particular a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas de Tau modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son insolubles en el cuerpo de mamíferos o humano, más en particular en el cerebro, respectivamente. "Tau insoluble" incluye en particular los ovillos neurofibrilares (NFT).

Las expresiones "Tau monomérica" o "monómero de Tau", como se usan en el presente documento, se refieren a proteínas Tau totalmente solubilizadas sin complejos agregados en medio acuoso.

Las expresiones "Tau agregada", "Tau oligomérica" y "oligómero de Tau", como se usan en el presente documento, se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o de péptidos/proteínas similares a Tau, o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles o solubles tanto *in vitro* en medio acuoso como *in vivo* en el cuerpo de mamíferos o humano más en particular en el cerebro, pero en particular a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas de Tau modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son insolubles o solubles en el cuerpo de mamíferos o humano, más en particular en el cerebro, respectivamente.

Las expresiones "PHF de pTau", "PHF" y "filamentos helicoidales emparejados", se usan en el presente documento como sinónimos, se refieren a pares de filamentos enrollados en hélices con una periodicidad de 160 nm visibles en microscopía electrónica. La anchura 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 neuropilares. También pueden observarse PHF en algunas neuritas distróficas asociadas a placas neuríticas, aunque no en todas. El principal componente de los PHF es una forma hiperfosforilada de la proteína tau asociada a microtúbulos. Los PHF pueden estar parcialmente compuestos por proteínas Tau hiperfosforiladas antiparalelas unidas por disulfuro. Tau de PHF puede estar truncada en sus 20 restos de aminoácidos C-terminales. Los mecanismos subyacentes a la formación de PHF son inciertos, pero la hiperfosforilación de Tau puede desacoplarla de los microtúbulos, aumentando la reserva soluble de Tau a

partir de la cual pueden formarse PHF en el interior de las neuronas.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y sus variaciones gramaticales, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se esté tratando y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o la reaparición de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación de la patología y la remisión o la mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

La expresión "enfermedad de Alzheimer temprana" o "EA temprana", como se usa en el presente documento (por ejemplo, un "paciente diagnosticado con EA temprana" o un "paciente que padece EA temprana"), incluye pacientes con deterioro cognitivo leve, tal como un déficit de memoria, debido a la EA y pacientes que tienen biomarcadores de EA, por ejemplo, pacientes positivos para amiloide.

La expresión "enfermedad de Alzheimer leve" o "EA leve", como se usa en el presente documento (por ejemplo, un "paciente diagnosticado con EA leve"), se refiere a un estadio de EA caracterizado por una puntuación de MMSE de 20 a 26.

La expresión "enfermedad de Alzheimer leve a moderada" o "EA leve a moderada", como se usa en el presente documento, abarca la EA tanto leve como moderada, y se caracteriza por una puntuación de MMSE de 18 a 26.

La expresión "enfermedad de Alzheimer moderada" o "EA moderada", como se usa en el presente documento (por ejemplo, un "paciente diagnosticado con EA moderada"), se refiere a un estadio de EA caracterizado por una puntuación de MMSE de 18 a 19.

El término "MMSE" se refiere al Mini examen del estado mental, que proporciona una puntuación entre 1 y 30. Véase Folstein, *et al.*, 1975, *J. Psychiatr. Res.* 12:189-98. Las puntuaciones de 26 o menos generalmente se consideran indicativas de un déficit. Cuanto menor sea la puntuación numérica en el MMSE, mayor será el déficit o deterioro del paciente evaluado con respecto a otro individuo con una puntuación más baja. Un aumento en la puntuación de MMSE puede ser indicativo de una mejora del estado del paciente, mientras que una disminución en la puntuación de MMSE puede indicar un empeoramiento del estado del paciente.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión".

## II. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

Se proporcionan anticuerpos que se unen a Tau, como se define en las reivindicaciones. Un anticuerpo de la invención se une a un epítopo dentro de los aminoácidos de Tau 2 a 24 y se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítopo de Tau humana que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFEV рMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítopo de Tau de macaco cangrejero que tiene, o consiste en, la secuencia AEPRQEFDV рMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 4). En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a un epítopo de Tau humana que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFEV рMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 2) y un epítopo de Tau de macaco cangrejero que tiene, o que consiste en, la secuencia AEPRQEFDV рMEDHAGTYGLGDRK (SEQ ID NO: 4).

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

### A. Anticuerpos anti-Tau de ejemplo

El anticuerpo anti-Tau de la presente invención comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 342; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 344; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 345; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 346; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347.

El anticuerpo anti-Tau descrito anteriormente puede ser humanizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-Tau comprende HVR como las anteriores y además comprende un marco aceptor humano, por ejemplo, un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano.

En otra realización, el anticuerpo anti-Tau comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 340. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Tau que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Tau. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en la SEQ ID NO: 340. En los anticuerpos reivindicados, dichas sustituciones, inserciones o supresiones se producen fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-Tau comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO: 340, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otra realización, el anticuerpo anti-Tau comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 341. En determinadas realizaciones, una secuencia de VL que tiene al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o supresiones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-Tau que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a Tau. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en la SEQ ID NO: 341. Opcionalmente, el anticuerpo anti-Tau comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO: 341, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-Tau, en donde el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-Tau, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349. En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-Tau, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo anti-Tau de acuerdo con cualquiera de las anteriores realizaciones es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo químérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-Tau es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o fragmento F(ab')<sub>2</sub>. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 inalterado u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-Tau de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, como se describe en las Secciones 1-7 a continuación:

### **1. Afinidad de anticuerpos**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento 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  $\leq 0,001 \text{nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o inferior, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ ).

En algunas realizaciones, la  $K_D$  se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En algunas realizaciones, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de valoración de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren durante la noche placas multipicillo MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 µg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea 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.º 269620), se mezclan [<sup>125</sup>I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Despues, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Despues, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/picillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la  $K_D$  se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígenos inmovilizados en ~10 unidades de resonancia (UR). En algunas realizaciones, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. 5 Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para alcanzar aproximadamente 10 unidades de resonancia (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de 10 cinética, se inyectan diluciones seriadas de factor dos de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 al 0,05 % (TWEEN-20™) (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación ( $k_{\text{asociación}}$ ) y las velocidades de disociación ( $k_{\text{disociación}}$ ) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno (BIACORE® Evaluation Software, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calcula como la relación  $k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$ . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación 15 supera  $10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## 2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. 25 Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para una revisión de algunos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para una revisión de fragmentos scFv, véanse, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las Patentes de los EE.UU. N.º 5.571.894 y 5.587.458. Para 30 un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden restos de epítopo de unión a receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* aumentada, véase la Patente de los EE.UU. N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos 35 también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En 40 determinadas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.248.516 B1).

Los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, la digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento. 45

## 3. Anticuerpos químéricos y humanizados

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo químérico. 50 Se describen determinados anticuerpos químéricos, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo químérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo químérico es un anticuerpo "con la clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase con respecto a la del anticuerpo precursor. Los anticuerpos químéricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo químérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad para seres humanos, a la vez que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano precursor. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR, (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas realizaciones, se sustituyen algunos restos de FR en un anticuerpo humanizado por restos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los restos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo. 60 65

Los anticuerpos humanizados y los métodos para fabricarlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989); las Patentes de los EE.UU. N.º 5. 821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmire *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de regiones determinantes de la especificidad (SDR, por sus siglas en inglés)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe la "modificación de la superficie"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

- 5 Las regiones marco conservadas humanas que pueden usarse para humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco conservadas seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco conservadas derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones marco conservadas humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones marco conservadas de estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco conservadas derivadas del cribado de bibliotecas de FR (véanse, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).
- 10
- 15
- 20
- 4. Anticuerpos humanos**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden prepararse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos, de manera general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

25 Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígenos. Dichos animales normalmente contienen la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humanos, que sustituyen los locus endógenos de la inmunoglobulina, o que están presentes extracromosómicamente o integrados de forma aleatoria en los cromosomas de los animales. En dichos ratones transgénicos, generalmente se han inactivado los locus de inmunoglobulina endógenos. Para una revisión de los métodos para obtener anticuerpos humanos derivados de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véanse también, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 6.075.181 y 6.150.584, que describen la tecnología XENOMOUSE™; la Patente de los EE.UU. N.º 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; la Patente de los EE.UU. N.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la Publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas derivadas de anticuerpos inalterados generados por dichos animales pueden modificarse, además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

30

35

40

45

50

55

También pueden prepararse anticuerpos humanos mediante métodos a base de hibridoma. Se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) También se describen anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los métodos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de estirpes celulares de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas de 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 and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También pueden generarse anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable de clon de Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación en fagos de origen humano. Posteriormente, pueden combinarse dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

**5. Anticuerpos derivados de bibliotecas**

60 Los anticuerpos de la invención pueden aislar criando bibliotecas combinatorias con respecto a anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, en la técnica se conocen diversos métodos para generar bibliotecas de presentación en fagos y para cribar dichas bibliotecas con respecto a anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos métodos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ,

2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

- 5 En determinados métodos de presentación en fagos, se clonian por separado repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en fagotecas, que posteriormente pueden cribarse con respecto a fagos de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos normalmente presentan fragmentos de anticuerpo, ya sea en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o en forma de fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratar puede clonarse (por ejemplo, a partir de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos contra una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también pueden producirse sintéticamente bibliotecas sin tratar clonando segmentos de gen V no reordenados de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen fagotecas de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la Patente de los EE.UU. N.º 5.750.373 y las publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.
- 10 15 20
- En el presente documento, se considera que los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos, son anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

### 6. Anticuerpos multiespecíficos

- 25 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para una Tau y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es para Tau y la otra es para beta amiloide. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de Tau. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan Tau. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo.
- 30 35 40 45
- Las técnicas para producir anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la modificación por ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.731.168. También pueden producirse anticuerpos multiespecíficos modificando por ingeniería efectos de direccionamiento electrostático para producir moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004A1); entrecruzando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv (sFv) monocatenarios (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos, como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

50 Los anticuerpos modificados por ingeniería con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos Octopus", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

55 60

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de acción dual" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a Tau, así como a otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

### 7. Variantes de anticuerpos

65 En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones adecuadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígeno.

#### a) Variantes de sustitución, inserción y supresión

En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones de ejemplo", y como se describen adicionalmente a continuación en referencia a las clases de las cadenas laterales de aminoácidos. En un anticuerpo de interés pueden introducirse sustituciones de aminoácidos y los productos pueden cribarse para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejoradas.

10

TABLA 1

Resto original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
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 agruparse de acuerdo con las propiedades comunes de las cadenas laterales:

15

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

20

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

25

Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este método, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o adicionalmente, puede usarse una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y

restos próximos pueden seleccionarse como diana o eliminarse como candidatos para la sustitución. Pueden cribarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

5 Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo con un intervalo de longitudes de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

10

**b) Variantes de glicosilación**

15 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o reducir el alcance de glicosilación del anticuerpo. La adición o supresión de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que se crea o elimina más de un sitio de glicosilación.

20 Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, puede alterarse el hidrato de carbono unido a la misma. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido biantenario ramificado, que está unido generalmente mediante una unión N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

25 En algunas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidratos de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado a aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia minoritarias en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de ADCC mejorada. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de patente de los EE.UU. N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 40 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; el documento WO2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la Solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el Ejemplo 11) y estirpes celulares con supresión génica, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con supresión génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

55 Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenario unido a la región Fc del anticuerpo se biseca mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la Patente de los EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

**c) Variantes de la región Fc**

65 En determinadas realizaciones, en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos, generando de este modo una variante de la región Fc. La

variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

- 5 En determinadas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que tiene algunas, pero no todas, las funciones efectoras, lo que la convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de actividad de unión a FcγR (careciendo, por tanto, probablemente de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan, FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de los EE.UU. N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) y Hellstrom, I *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayo no radiactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para citometría de flujo (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 (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como se divulga en Clynes *et al.* *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, el ensayo ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y de aclaramiento/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

35 Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con la sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (Patente de los EE.UU. 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, incluyendo el mutante de Fc llamado "DANA" con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (Patente de los EE.UU. N.º 7.332.581).

40 Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a FcR. (Véase, (por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

45 En determinadas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los restos).

50 En algunas realizaciones, se han realizado alteraciones en la región Fc que dieron como resultado una unión alterada (es decir, tanto aumentada como disminuida) a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 6.194.551, el documento WO 99/51642, y en Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

55 Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.* *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Dichos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas que tienen sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del resto 434 de la región Fc (Patente de los EE.UU. N.º 7.371.826).

60 Véanse también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la Patente de los EE.UU. N.º 5.648.260; la Patente de los EE.UU. N.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 en referencia a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

**d) Variantes de anticuerpo modificadas por ingeniería con cisteína**

65 En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos restos por cisteína,

se colocan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de enlazador-fármaco, para crear un inmunoconjungado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas realizaciones, puede sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera;

5 A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína como se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 7.521.541.

**e) Derivados de anticuerpos**

10 En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos adicionales no proteicos conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de 15 etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en 20 agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que han de mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

25

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En algunas realizaciones, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede tener cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que las mueren células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

30

**B. Métodos y composiciones recombinantes**

35 Los anticuerpos pueden producirse usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 4.816.567. En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-Tau descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En algunas realizaciones, se proporciona un método de producción de un anticuerpo anti-Tau, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o del medio de cultivo de la célula hospedadora).

40

45

50

55 Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-Tau, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

60 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de los vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando las funciones de glicosilación y efectora de Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Despues de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

65

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

5 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glicosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que pueden usarse junto con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

10 También pueden usarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 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).

15 15 También pueden usarse como hospedadores células de vertebrado. Por ejemplo, pueden ser útiles estirpes celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de células de mamífero útiles son la estirpe CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7); la estirpe de riñón de embrión humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 tal como se describe, por ejemplo, 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 de cuello de útero humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describen, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 20 25 5; y células FS4. Otras estirpes celulares de mamífero hospedadoras útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células DHFR- CHO (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y estirpes celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas estirpes celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003).

### 30 C. Ensayos

35 Los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento pueden identificarse, cribarse o caracterizarse para determinar sus propiedades físicoquímicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

#### 1. Ensayos de unión y otros ensayos

40 En una divulgación, se somete a ensayo un anticuerpo de la invención para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos tales como ELISA, transferencia Western, etc.

45 En otra divulgación, pueden usarse ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo descrito en el presente documento por la unión a Tau. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que está unido por 94B2-C1, 125B11-H3, 37D3-H9 o hu37D3-H9.v28.A4. Se proporcionan métodos detallados para mapear un epítopo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

50 50 En un ensayo de competencia de ejemplo, se incuba Tau inmovilizada (tal como Tau monomérica) en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a Tau (por ejemplo, cualquier anticuerpo descrito en el presente documento, tal como hu37D3-H9.v28.A4) y un segundo anticuerpo no marcado que se está sometiendo a ensayo por su capacidad de competir con el primer anticuerpo para unirse 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 marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Despues de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo a Tau, se retira el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado a Tau inmovilizada. Si la cantidad de marcador asociado a Tau inmovilizada se encuentra sustancialmente reducida en la muestra de ensayo con respecto a la muestra de control, entonces, esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo por la unión a Tau. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

#### 60 60 2. Ensayos de actividad

65 En una divulgación, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-Tau (por ejemplo, pan-Tau) de los mismos que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión de dichos anticuerpos a múltiples formas de Tau (por ejemplo, Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada) y reducir el nivel de proteína Tau (por ejemplo, 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 contienen Tau hiperfosforilada, en el cerebro, por ejemplo, en la corteza cerebral y/o el hipocampo). También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

5 En una divulgación, se somete a ensayo dicha actividad biológica en un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, un modelo animal de tauopatía, tal como un ratón transgénico Tau (por ejemplo, P301L), puede usarse para detectar la unión de anticuerpos anti-Tau a secciones de cerebro y, por ejemplo, a ovillos neurofibrilares en los cerebros de los ratones transgénicos. Además, un modelo animal de tauopatía, tal como un ratón transgénico para Tau (por ejemplo, P301L), puede tratarse con anticuerpos anti-Tau y pueden usarse técnicas experimentales conocidas en la técnica para evaluar si dicho tratamiento reduce el nivel de proteína Tau (por ejemplo, Tau total, Tau soluble total, Tau fosforilada soluble, Tau soluble no fosforilada, Tau insoluble total, Tau fosforilada insoluble, Tau no fosforilada insoluble, Tau hiperfosforilada o filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada) en el cerebro de ratón (por ejemplo, en la corteza cerebral y/o el hipocampo).

10 **D. Inmunoconjungados**

Los anticuerpos de la presente invención pueden estar presentes en inmunoconjungados que comprenden el anticuerpo anti-Tau conjugado con uno o más agentes terapéuticos o isótopos radiactivos.

15 Un inmunoconjungado puede comprender un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjungado. Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjungados. Los ejemplos incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el radioconjungado se usa para la detección, éste puede comprender un átomo radiactivo para realizar estudios gammagráficos, por ejemplo, tc99m o I123, o un marcador de espín para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) (también conocida como obtención de imágenes por resonancia magnética, MRI, por sus siglas en inglés), tales como, nuevamente, yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

20 Pueden fabricarse conjungados de un anticuerpo usando una diversidad 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 de 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 bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992); Patente de los EE.UU. N.º 5.208.020).

25 Los inmunoconjungados o ADC del presente documento contemplan expresamente, pero sin limitación, dichos conjungados preparados con reactivos de entrecruzamiento incluyendo, pero sin limitación, 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) que se encuentran disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

30 **E. Métodos y composiciones para diagnósticos y detección**

35 Cualquiera de los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento puede ser útil para detectar la presencia de Tau en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como líquido cefalorraquídeo, una célula o tejido del cerebro (por ejemplo, corteza cerebral o hipocampo), o sangre. En algunas realizaciones, una muestra biológica es líquido cefalorraquídeo.

40 El anticuerpo anti-Tau puede ser útil en un método de diagnóstico o detección o en un método de detección de la presencia de Tau en una muestra biológica. El método puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-Tau como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-Tau a Tau y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-Tau y Tau. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. Además, el complejo formado entre el anticuerpo anti-Tau y Tau en una muestra biológica de ensayo puede compararse con el complejo formado en una muestra biológica de control (por ejemplo, una muestra biológica de un sujeto o sujetos sanos). La cantidad del complejo formado entre el anticuerpo anti-Tau y Tau en una muestra biológica de ensayo también puede cuantificarse y compararse con la cantidad del complejo formado en una muestra biológica de control (por ejemplo, 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.

Puede usarse un anticuerpo anti-Tau para seleccionar sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti-Tau, por ejemplo, donde Tau es un biomarcador para la selección de pacientes. Por ejemplo, se usa un anticuerpo anti-Tau (por ejemplo, pan-Tau) para detectar si el sujeto padece una enfermedad o trastorno de la proteína Tau, o si el sujeto tiene un riesgo alto (o predisposición) de padecer una enfermedad o trastorno de la proteína Tau.

Las enfermedades o trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades o trastornos asociados a la proteína Tau, y enfermedades o trastornos provocados por o asociados a la formación de ovillos neurofibrilares o hilos neuropilares. En algunas realizaciones, las enfermedades o trastornos que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen enfermedades o trastornos asociados a la proteína Tau que se manifiestan en un deterioro o pérdida de las funciones cognitivas, incluyendo el razonamiento, el criterio situacional, la capacidad de memoria, el aprendizaje y/o la navegación especial. En particular, las enfermedades o trastornos que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen las tauopatías, tales como las tauopatías neurodegenerativas. Las enfermedades o trastornos de ejemplo que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirófilos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, degeneración pálido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos únicamente, parkinsonismo postencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, un trastorno que puede diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención es la enfermedad de Alzheimer (EA).

Los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento pueden estar marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{3}\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelíferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de los EE.UU. N.º 4.737.456), 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasa heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas a una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un colorante precursor tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

## 40 F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-Tau como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables en general son atóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitación: agua estéril, tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencílio 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 restos); 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 hidratos de carbono incluyendo 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 (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo en el presente documento incluyen además agentes para la dispersión intersticial de fármacos tales como glucoproteínas de hialuronidasa neutras-activas (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP de ejemplo y métodos de uso, incluyendo rHuPH20, se describen en las Publicaciones de patente de los EE.UU. N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

65 Las formulaciones de anticuerpo de ejemplo se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 6.267.958. Las formulaciones acuosas de anticuerpo incluyen aquellas descritas en la Patente de los EE.UU. N.º 6.171.586 y en el

documento WO2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo, según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Dichos principios activos están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de polí(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divultan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que han de usarse para la administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

#### **G. Métodos y composiciones terapéuticos**

Cualquiera de los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento puede usarse en métodos terapéuticos.

El anticuerpo anti-Tau de la presente invención puede usarse como medicamento. En un aspecto, se proporciona el anticuerpo anti-Tau para su uso en el tratamiento de una tauopatía tal como una tauopatía neurodegenerativa. Los ejemplos de enfermedades o trastornos asociados a la proteína Tau que pueden tratarse con anticuerpos anti-Tau incluyen, sin limitación, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirófilos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, degeneración pálido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos únicamente, parkinsonismo postencefálico y distrofia miotónica. En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona el anticuerpo anti-Tau para su uso en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer (EA). En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona el anticuerpo anti-Tau para su uso en el tratamiento de la EA moderada, la EA de leve a moderada, la EA leve, la EA temprana o la EA prodrómica. Además, las enfermedades o trastornos asociados a la proteína Tau que pueden tratarse con el anticuerpo anti-Tau incluyen enfermedades o trastornos que se manifiestan en un deterioro o pérdida de una función cognitiva como el razonamiento, el criterio situacional, la capacidad de memoria, el aprendizaje y/o la navegación especial. El tratamiento puede comprender además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención se usa 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 de entre 22 y 26. Como se usa en el presente documento, una puntuación de MMSE entre dos números incluye los números en cada extremo del intervalo. Por ejemplo, una puntuación de MMSE de entre 22 y 26 incluye puntuaciones MMSE de 22 y 26.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar a un individuo que es "positivo para tau", por ejemplo, un paciente que tiene depósitos de tau cerebrales que son típicos de los trastornos asociados a la proteína Tau, por ejemplo, un paciente con un escáner PET positivo para Tau.

Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en la reducción de los niveles de proteína Tau (por ejemplo, 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 producirse en el cerebro (por ejemplo, en la corteza cerebral y/o en el hipocampo). Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en la reducción de los niveles de Tau fosforilada. Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en la reducción de los niveles de Tau insoluble (por ejemplo, Tau fosforilada insoluble). Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en la reducción de los niveles de Tau hiperfosforilada. Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en la reducción de los niveles de filamentos helicoidales emparejados (por ejemplo, filamentos helicoidales emparejados que contienen Tau hiperfosforilada) en un tejido cerebral (por ejemplo, en la corteza cerebral y/o el

hipocampo). Un anticuerpo anti-Tau puede encontrar un uso en un método de reducción de los niveles de proteína Tau (por ejemplo, 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 (por ejemplo, en la corteza cerebral y/o el hipocampo) en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-Tau para reducir los niveles de proteína Tau. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores es un mamífero, preferentemente un ser humano.

5 El anticuerpo anti-Tau o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau pueden usarse para aliviar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o

10 trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA). El anticuerpo anti-Tau o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau puede usarse para reducir el número de síntomas o la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA). El síntoma de una enfermedad o trastorno

15 asociado a la proteína Tau puede ser un deterioro de la cognición. El síntoma de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau puede ser una alteración del aprendizaje y/o de la memoria. El síntoma de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau puede ser una pérdida de memoria a largo plazo. El síntoma de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau puede ser la demencia. El síntoma de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau puede ser confusión, irritabilidad, agresión, cambios de humor o un deterioro del lenguaje. El síntoma de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau puede ser un deterioro o pérdida de una o más funciones

20 cognitivas, tales como el razonamiento, el criterio situacional, la capacidad de memoria y/o el aprendizaje.

En aspectos específicos, la invención proporciona el anticuerpo anti-Tau de la invención o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva o para ralentizar la pérdida de memoria asociada a una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA). Los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la administración de una cantidad (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo anti-Tau a un individuo (por ejemplo, que muestra uno o más síntomas de pérdida de memoria o una disminución de la capacidad de memoria).

30 El anticuerpo anti-Tau o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau puede ser útil para disminuir la tasa de progresión de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA).

35 El anticuerpo anti-Tau o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau puede ser útil para prevenir el desarrollo de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA).

El anticuerpo anti-Tau o un medicamento que comprende el anticuerpo anti-Tau puede ser útil para retrasar el desarrollo de la enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau (tal como cualquiera de las enfermedades o trastornos descritos en el presente documento, por ejemplo, la EA). Los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la administración de una cantidad (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) de un anticuerpo anti-Tau a un individuo (por ejemplo, que muestra uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno asociado a la proteína Tau).

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-Tau proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

50 Los anticuerpos de la invención pueden usarse o bien solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede administrarse junto con al menos un agente terapéutico adicional.

55 Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención puede administrarse en combinación con otras composiciones que comprendan un agente terapéutico adicional, tal como una sustancia o un compuesto biológicamente activos tales como, por ejemplo, un compuesto conocido utilizado en la medicación de las tauopatías y/o de las amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados al amiloide o a proteínas similares al amiloide, tales como la proteína  $\beta$  amiloide implicada en la enfermedad de Alzheimer.

60 En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión neuronal, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminas biogénas, tranquilizantes benzodiacepínicos, potenciadores de la síntesis, el almacenamiento o la liberación de acetilcolina, agonistas de los receptores postsinápticos de acetilcolina, inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, antagonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, antagonistas de los receptores serotoninérgicos u otros agentes terapéuticos. En particular, el agente o compuesto

biológicamente activo puede comprender al menos un compuesto seleccionado de los compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelatos metálicos, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la secretasa, inhibidores de la beta y gamma-secretasa, proteínas tau, anticuerpos anti-Tau (incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos divulgados en los documentos WO2012049570, WO2014028777, WO2014165271, WO2014100600, WO2015200806, US8980270 y US8980271), neurotransmisores, rompedores de láminas beta, moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de la colinesterasa (AChE) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B 12, cisteína, un precursor de la acetilcolina, lecitina, colina, *Ginkgo biloba*, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina o un derivado de xantina, junto con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluya anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, y, opcionalmente, un vehículo 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 administrarse en combinación con un fármaco neurológico. Dichos fármacos neurológicos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluyendo, pero sin limitación, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otro aglutinante de proteínas) que se une específicamente a una diana seleccionada de: beta secretasa, presenilina, proteína precursora de amiloide o porciones de las mismas, péptido beta amiloide u oligómeros o fibrillas del mismo, receptor de muerte 6 (DR6), receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés), parkina y huntingtina; un antagonista del receptor de NMDA (es decir, memantina), un reductor de monoaminas (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloido; un agente antiparkinsoniano anticolinérgico (es decir, procyclidina, difenhidramina, trihexilfenidilo, benzotropina, biperideno y trihexilfenidilo); un agente antiparkinsoniano dopamínérgico (es decir, entacapona, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (incluyendo, pero sin limitación, un antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos enumerados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprolida); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3-aminopropanosulfónico; 3APS); un modulador de la actividad de receptores de serotonina (es decir, xaliprodeno); un interferón y un glucocorticoide o corticoesteroide. El término "corticoesteroide" incluye, pero sin limitación, fluticasona (incluyendo propionato de fluticasona (FP)), beclometasona, budesonida, ciclesonida, mometasona, flunisolida, betametasona y triamcinolona. "Corticosteroide inhalable" significa un corticoesteroide que es adecuado para su suministro mediante inhalación. Son corticoesteroideos inhalables de ejemplo fluticasona, dipropionato de beclometasona, budenosida, furoato de mometasona, ciclesonida, flunisolida y acetónido de triamcinolona.

En algunas realizaciones, uno o más anticuerpos anti-beta amiloide (anti-Abeta) pueden administrarse con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de dichos anticuerpos anti-Abeta incluyen solanezumab, solanezumab, bapineuzumab, aducanumab, gantenerumab y BAN-2401 (Biogen, Eisai Co., Ltd.). En algunas realizaciones, uno o más inhibidores de la agregación de beta-amiloide pueden administrarse con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento. Los inhibidores de la agregación de beta-amiloide de ejemplo no limitante incluyen ELND-005 (también denominado AZD-103 o escilo-inositol), tramiprosato y PTI-80 (Exebryl-1®; ProteoTech). En algunas realizaciones, pueden administrarse uno o más inhibidores de BACE con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento. Los ejemplos no limitantes 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, uno o más inhibidores de Tau pueden administrarse con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de dichos inhibidores de Tau incluyen metiltioninio, LMTX (también conocido como leucometiltioninio o Trx-0237; TauRx Therapeutics Ltd.), Rember™ (azul de metileno o cloruro de metiltioninio [MTC]; Trx-0014; TauRx Therapeutics Ltd), PBT2 (Prana Biotechnology) y PTI-51-CH3 (TauPro™; ProteoTech). En algunas realizaciones, uno o más anticuerpos anti-Tau pueden administrarse con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de dichos otros anticuerpos anti-Tau incluyen BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb) y C2N-8E12 (AbbVie, C2N Diagnostics, LLC). En algunas realizaciones, un inhibidor general del plegamiento erróneo, tal como NPT088 (NeuroPhage Pharmaceuticals), puede administrarse con un anticuerpo anti-Tau proporcionado en el presente documento.

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

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de los síntomas psicóticos positivos y negativos, incluyendo alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por una marcada incoherencia, descarrilamiento, tangencialidad) y comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía y retraimiento social, junto con el anticuerpo químérico o el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención o fragmentos activos de los mismos y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente

farmacéuticamente aceptables.

Otros compuestos que pueden usarse adecuadamente en composiciones además del anticuerpo químérico o anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención, son aquellos divulgados, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17), incluyendo dianas farmacológicas terapéuticas (páginas 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanoalulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas de los 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 peroxisomas (PPAR) (páginas 63-67), agentes hipocolesterolémiantes (páginas 68-75); inhibidores

5 de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que 10 aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

15 Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración por separado, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de, simultáneamente y/o 20 después de, la administración del agente o los agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la administración del anticuerpo anti-Tau y la administración de un agente terapéutico adicional se producen con una separación de aproximadamente un mes o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

25 Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, intrapulmonar e intransal, y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, 30 intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones únicas o múltiples en diversos puntos temporales, la administración en embolada y la infusión en pulsos.

35 Los anticuerpos de la invención podrían formularse, dosificarse y administrarse de una forma acorde con la buena práctica médica. Los factores a tener en cuenta en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los profesionales sanitarios. No es necesario, pero el anticuerpo opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente con las mismas dosis y por vías de administración como las 40 descritas en el presente documento o de aproximadamente el 1 al 99 % de las dosis descritas en el presente documento o en cualquier dosis y por cualquier vía que se haya determinado empíricamente/clínicamente como adecuada.

45 Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales diferentes) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y de la evolución de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, 50 aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1mg/kg-10mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones distintas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria habitual estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se continuará generalmente con el tratamiento hasta que se produzca 55 una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente 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 las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, 60 aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial superior, seguida de una o más dosis inferiores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

65 Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores puede realizarse usando un inmunoconjunto como se describe en el presente documento en lugar de, o además de, un anticuerpo anti-Tau.

## H. Artículos de fabricación

En el presente documento también se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en el envase sobre o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden estar formados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la enfermedad, y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Más aún, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico adicional. El artículo de fabricación puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjungado como se describe en el presente documento en lugar de o además de un anticuerpo anti-Tau.

## 25 III. Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas realizaciones diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

### 30 Ejemplo 1: Generación de Tau para la inmunización

#### *Generación de Tau recombinante monomérica*

35 La construcción de Tau humana recombinante, isoforma 2N4R (aminoácidos 2-441), se fusionó con un marcador His N-terminal para facilitar su purificación y caracterización. Véase, por ejemplo, la Figura 15. La construcción de fusión se clonó en el vector pET52b (Novagen) y se expresó en *E. coli*. Las células se recogieron y se lisaron en condiciones de desnaturación usando cloruro de guanidinio 7M durante la noche a 4 °C con agitación. Los desechos celulares se sedimentaron a 40.000 rpm durante 1 hora. La proteína recombinante marcada con His se aisló mediante cromatografía de afinidad con níquel (resina de afinidad Ni Sepharose excel, GE Healthcare Life Sciences) seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (resina Superdex 200, GE Healthcare Life Sciences) en condiciones desnaturizantes. El cloruro de guanidinio se eliminó dializando la proteína recuperada en MES 20 mM, NaCl 50 mM y TCEP 1 mM a pH 6,8. Posteriormente se eliminó el marcador His usando la proteasa TEV, seguido de una purificación final usando cromatografía de intercambio catiónico (columna Mono S, GE Healthcare Life Sciences) para eliminar el marcador His escindido. El tampón de purificación contenía Triton x-114 al 0,1 % (v/v) para eliminar la endotoxina. La proteína purificada se intercambió en PBS con TCEP 1 mM. La pureza y el estado monomérico se analizaron mediante SDS-PAGE y SEC-MALLS. La identidad se confirmó mediante espectrometría de masas. La concentración de proteína se determinó mediante absorción UV a 280 nm. El producto final estaba exento de endotoxinas (<0,5 UE/mg), como se determina el ensayo Cinético de Lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

#### 50 *Generación de Tau fosforilada*

La Tau fosforilada se generó usando la construcción Tau 2-441 preparada usando el método descrito anteriormente. La construcción proteica se fosforiló usando PKA cinasa 0,5 µM (Life Technologies), que fosforila la serina 409, entre otros restos. La mezcla de reacción se incubó con ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, a temperatura ambiente durante 72 horas. 55 La fosforilación se confirmó mediante espectrometría de masas. Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 75, GE Healthcare Life Sciences) para eliminar la cinasa. La pureza, el estado monomérico y el nivel de endotoxina de la preparación de proteína fosforilada se analizaron sustancialmente como se ha descrito anteriormente.

#### *Oligomerización in vitro de Tau monomérica*

60 Se generó Tau oligomérica a partir de la construcción Tau 2-441 monomérica. La proteína monomérica se intercambió primero en ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES) 20 mM, NaCl 25 mM, pH 7,4, seguido de oligomerización usando ácido araquidónico 75 µM (Cayman Chemicals) y heparina de 18 kDa (Sigma Aldrich), a concentración equimolar con la proteína a 37 °C durante 3 días. La oligomerización se confirmó mediante un ensayo de fluorescencia con tioflavina T, dispersión dinámica de la luz (DLS) y cromatografía analítica de exclusión por tamaño. La Tau oligomérica se denomina, en algunos casos, "oligoTau".

**Ejemplo 2: Generación de anticuerpos anti-Tau****Métodos**

5

***Generación de hibridomas***

Se recibieron ratones de tipo silvestre hembra C57BL/6JOlaHsd (C57BL/6) y BALB/c OlaHsd (Balb/c) (Harlan, EE.UU.) a las 9 semanas de edad. Se recibieron ratones con inactivación de Tau (B6.129-Maptm1Hnd/J; The Jackson Laboratory, EE.UU.) a las 6 y 9 semanas de edad. Las vacunaciones comenzaron entre las 12 y las 15 semanas de edad. Los ratones se vacunaron con Tau humana oligomerizada. Antes de la vacunación, la oligoTau se mezcló con uno de los dos adyuvantes utilizados en este estudio, Sistema adyuvante Ribi (Ribi; Sigma-Aldrich, Suiza) al 50 % v/v, o una combinación de oligodesoxinucleótidos de ADN sintéticos monocatenarios de CpG (CpG; Microsynth, Suiza) e hidróxido de aluminio (Al; Brenntag, Suiza). Ribi es una emulsión de aceite en agua de escualeno al 2 % que contiene monofosforil lípido A (aislado de *Salmonella minnesota*) y dicromomicolato de trehalosa sintético (aislado del factor cordonal del *Tubercle bacillus*) en aceite de escualeno, Tween-80 al 0,2 % y agua.

Los ratones se vacunaron mediante inyección subcutánea (s.c.), excepto los grupos D y G, que recibieron una combinación de administraciones intraperitoneales (i.p.) y en el corvejón. A los ratones del grupo D se les administraron 50 µg de oligoTau i.p. y 10 µg de oligoTau como inyección en el corvejón. A los ratones del grupo G se les administraron 8 µg de oligoTau i.p. y 2 µg de oligoTau como inyección en el corvejón. Véase la Tabla 2.

Para vacunaciones que contenían CpG y Al (CpG/Al) como adyuvante, cada inyección de 200 µl contenía 60 µg (30 nmol) de CpG, 1 mg de Al y 50 µg de oligoTau. Para todos los grupos de estudio, los ratones fueron inyectados los días 0, 14, 35 y 56. Se vacunó a los ratones utilizados para la fusión del mieloma (Nanotools, Alemania) adicionalmente con tres inyecciones diarias de refuerzo de oligoTau (50 µg por inyección i.p.) sin adyuvante añadido.

**Tabla 2. Ratones y protocolos de vacunación**

Grupo de estudio	Cepa de ratón	Dosis total de oligoTau (µg/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.
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.

30 Los ratones se desangraron y se sacrificaron un día después de la última de las tres inyecciones de refuerzo, y los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma para generar hibridomas productores de anticuerpos.

***Selección de hibridomas para la subclonación***

35 Para las fusiones, los ratones se dividieron 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), generando 299 hibridomas. Se cultivaron hibridomas viables usando medios de selección que contenían suero y los mejores hibridomas se seleccionaron para la subclonación, usando ensayos ELISA para la unión de Tau humana de longitud completa y oligoTau, como se describe a continuación. Después de la dilución limitante, los hibridomas finales después se cultivaron en medio exento de suero y los medios se recogieron de las colonias estables para el cribado y la selección de anticuerpos.

***Ensayos de cribado ELISA***

45 Se recogieron sobrenadantes exentos de suero de hibridomas estables. Después, los sobrenadantes que contenían anticuerpos de interés se cribaron mediante ensayos ELISA para caracterizar las propiedades de los anticuerpos y seleccionarlos para su posterior desarrollo. Los ensayos ELISA se utilizaron para determinar lo siguiente: unión a Tau humana de longitud completa (fTau; SignalChem, Canadá), unión a fTau hiperfosforilada (Genentech, EE.UU.), unión a preparaciones oligoméricas frente a monoméricas de fTau, y unión a uno o más epítopos de anticuerpo Tau determinados. Brevemente, se recubrieron placas ELISA MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) con una de las 50 dianas como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Dianas utilizadas para los ensayos de cribado ELISA.

Ensayo	Configuración de ELISA	Diana
Unión a fTau	ELISA directo	Tau humana de longitud completa (fTau) recubierta a 1 µg/ml
Unión a pTau	ELISA directo	Tau humana de longitud completa fosforilada <i>in vitro</i> usando 4 cinasas (GSK3β, Cdk5, PKA y CK1δ; Tau hiperfosforilada o pTau) se purificó y se recubrió a 1 µg/ml
Mapeo de epitopos	ELISA directo	Péptidos de 15-meros biotinilados que abarcan los 441 aminoácidos (aa) de la Tau humana con un desplazamiento de 9 aa y un solapamiento de 6 aa recubiertos a 10 µg/ml en una placa de 96 pocillos de estreptavidina
Unión a oligoTau	ELISA de captura	fTau oligomérica y monomérica biotinilada con marcador AVI capturada en solución por anticuerpos anti-IgG inmovilizados que se están sometiendo a ensayo

El recubrimiento se realizó durante la noche en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C. Las placas se lavaron minuciosamente con Tween-20 al 0,05 %/PBS y después se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en Tween-20 al 0,05 %/PBS durante 1 h a 37 °C. El anticuerpo contenido en el sobrenadante del hibridoma

5 después se añadió a las diluciones indicadas y se incubó durante 2 h a 37 °C, después de lo cual las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente.

10 Para los ELISA directos, se añadió un anticuerpo secundario anti-IgG ratón 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. Despues del lavado final, las placas se incubaron con hexahidrato de p-nitrofenil fosfato disódico (pNPP; Sigma-Aldrich, Suiza), solución de sustrato de fosfatasa y se leyó a 405 nm usando un lector de placas ELISA (Tecan, Suiza). Los resultados se expresan como densidades ópticas (D.O.).

15 Para los ensayos ELISA de captura de oligoTau y monoTau, los anticuerpos contenidos en sobrenadantes de hibridoma estériles exentos de suero se inmovilizaron en una placa recubierta con anti-IgG a una dilución de 500 veces, seguido de la incubación de oligoTau o monoTau, ambos con biotinilación específica a través de un marcador AVI. Las incubaciones diana comenzaron a 5 µg/ml y después se diluyeron 8 o 16 veces. Para la cuantificación de la señal se usó estreptavidina-HRP y sustrato ABTS en un lector de placas (Tecan, Suiza). Los resultados se expresan como D.O.

#### Estimaciones de afinidad

25 La afinidad de anticuerpos no purificados en sobrenadantes de hibridoma exentos de suero se estimó mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento Biacore T-100 (GE Healthcare, Reino Unido). Los anticuerpos se inmovilizaron en un chip biosensor anti-IgG y se usó fTau (SignalChem, Canadá) como analito diana. El análisis cinético se realizó usando un modelo de ajuste 1:1 de Langmuir.

#### Ensayos de SDS-PAGE y transferencia Western

30 La unión de los anticuerpos contra panTau seleccionados a Tau en el cerebro humano se sometió a ensayo en una transferencia Western (WB) usando lisados de cerebro de tres donantes con EA y dos donantes de control sin EA emparejados por edad (Tissue Solutions, Reino Unido). Los lisados se procesaron para obtener una fracción de Tau soluble exenta de detergentes. Los lisados procesados se cargaron en geles de bis-tris al 4-12 % (Novex, Life Technologies, Suiza) y se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon y se transfirieron con anticuerpos que se estaban sometiendo a ensayo y con un anticuerpo secundario IRDye 800CW antiratón de cabra (Li-Cor, EE.UU.).

#### Ensayo ELISA con lisados de cerebro humano

40 Para evaluar la unión de anticuerpos seleccionados a Tau humana no desnaturizada en lisados de cerebro de EA y de control, anticuerpos de sobrenadantes de hibridoma o un anticuerpo de control negativo y positivo, se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente. Después se capturó Tau en lisados solubles de cerebro humano procedentes de EA o de sujetos de control emparejados por edad (proteína 400 µg/ml; todo de Tissue Solutions, Reino Unido) y la detección se realizó usando un anticuerpo policonal panTau de conejo (AbCam, Reino Unido) seguido de un IgG-AP de conejo específico de fragmento Fc-γ (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.). Se usó lisado de cerebro del ratón con inactivación de Tau como muestra de control negativa. Las placas se incubaron con una solución de sustrato de fosfatasa pNPP (Sigma-Aldrich) y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA (Tecan, Suiza). Los resultados se expresan como densidades ópticas (D.O.).

#### 50 Secuenciación de hibridomas de anticuerpos

Se suministraron lisados de células de hibridoma a Antitope (Antitope, Reino Unido) para la secuenciación de genes

de región variable. Brevemente, se realizó una RT-PCR usando grupos de cebadores degenerados para secuencias señal murinas junto con cebadores de región constante para cada una de las cadenas pesada variable de IgG (VH), VH de IgM, ligera variable de Ig kappa (KVL) y VL de Ig λ. El ARNm de la región V de cadena pesada se amplificó usando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) específicos para las secuencias de señal VH junto con cebadores de la región constante específicos de IgM o IgG. El ARNm de región V de cadena ligera se amplificó usando un conjunto de ocho grupos de cebadores degenerados específicos de secuencia señal, siete para el grupo κ (KA a KG) y uno para el grupo λ (LA), junto con cebadores de región constante κ o λ. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación exitosa se purificaron, se clonaron en un vector de clonación "TA" (pGEM-T Easy, Promega), se transformaron en *E. coli* y se secuenciaron las colonias individuales. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones VH y VL del anticuerpo se determinaron con las secuencias para 27 hibridomas de anticuerpos.

#### Resultados

##### 15 *Selección de hibridomas para la subclonación*

Los hibridomas que se generaron a partir de cada una de las tres rondas de fusiones, un total de 299 hibridomas derivados de diez fusiones, se sometieron inicialmente a ensayos de unión a fITau, y los hibridomas seleccionados se sometieron además a ensayos de unión a pTau y a Tau oligomerizada. El objetivo era seleccionar anticuerpos que se unieran igual de bien a Tau y a Tau modificada postraduccionalmente, tal como Tau fosforilada u oligomérica. Para esto, se ejecutaron ensayos en hibridomas para seleccionar las mejores propiedades de panTau. Determinar la región de unión de anticuerpo y el epítopo Tau específico, la región de unión se determinó en primer lugar usando diferentes fragmentos de Tau y, después, una biblioteca de péptidos de Tau superpuestos de 15 monómeros que abarcaban la secuencia completa de 441 aminoácidos (aa) de la isoforma humana más larga de Tau. Se evitó intencionadamente un grupo de anticuerpos que se unían a regiones predeterminadas de Tau con el objetivo de maximizar la unión a diferentes formas de Tau modificadas postraduccionalmente y a las seis isoformas diferentes de Tau humana presentes en los seres humanos.

30 Las tres series de fusión dieron como resultado la generación de 133 hibridomas estables subclonados que se sometieron a cribado en busca de las mejores propiedades de panTau. Se usó una combinación de diferentes ensayos de cribado para estrechar el número de hibridomas de anticuerpos que tenían las propiedades preferidas para un anticuerpo panTau. Para comparar la unión de fITau y pTau, se sometieron a ensayo 90 hibridomas con los resultados de 24 hibridomas mostrados en la Figura 1A-F. Se había realizado un cribado inicial usando fragmentos de Tau para evitar seleccionar anticuerpos que se unieran a regiones de Tau conocidas por tener una alta densidad de restos que se fosforilan en la enfermedad de Alzheimer (EA) y otras tauopatías, la mayoría de los anticuerpos sometidos a ensayo se unieron tanto a fITau como a pTau con propiedades de unión similares determinadas mediante este ELISA.

40 En algunas realizaciones, es deseable que un anticuerpo panTau se una tanto a las formas monoméricas como oligoméricas de Tau sin una fuerte preferencia por una u otra. Se configuró un ELISA de captura para determinar si los anticuerpos se unían tanto a las formas monoméricas como oligoméricas de fITau. Un ELISA ejecutado en modo de captura conserva la conformación oligomérica de la Tau preoligomerizada y el estado monomérico de la monoTau mejor que cuando se ejecuta como un ELISA directo con las dianas inmovilizadas en una placa de ELISA.

45 Cada ensayo se realizó comparando directamente la unión de las dos formas de Tau a los 90 anticuerpos sometidos a ensayo. En cada ensayo se usaron como controles anticuerpos que se sabe que se unen preferentemente a la oligoTau o que no discriminan entre las dos formas de Tau. Los resultados de 18 hibridomas se muestran en la Figura 2A-E.

50 El mapeo de los epítopos es importante para seleccionar anticuerpos con buenas propiedades de panTau, ya que pueden evitarse los anticuerpos que se unen a regiones con alta densidad de posibles restos de pTau (Ser, Thr y Tyr). La unión a las seis isoformas de Tau humana también se usó como criterio de selección para un anticuerpo contra panTau. Los epítopos de panTau de los anticuerpos que se habían seleccionado inicialmente se verificaron y determinaron con mayor precisión usando una biblioteca de 49 péptidos, cada uno de los cuales tenía 15 aminoácidos (aa) que abarcaban toda la longitud de la Tau humana, con un solapamiento de 6 restos de aa y un desplazamiento de 9 aa. Los números de restos se basan en la isoforma más larga de Tau humana (441 aa). Se usaron anticuerpos no purificados a una dilución alta de 1/10 para verificar la unión frente a la no unión a todos los péptidos. El cribado de anticuerpos procedentes de 112 hibridomas previamente seleccionados mediante ELISA indicó la unión a 20 epítopos de Tau diferentes (Tabla 4).

60 **Tabla 4:** Epítopos de Tau para anticuerpos

Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)	Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)
14F5-D9	1-15	30A1-C9	73-87

# ES 2 991 587 T3

(continuación)

Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)	Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)
94B2-B12	1-15	30A1-D11	73-87
94B2-C1	1-15	28F5-G8	82-96
10A1-A6	10-24	28F5-H8	82-96
10A1-D8	10-24	33G9-A11	100-114
11E10-B8	10-24	33G9-B9	100-114
17G12-C11	10-24	52F2-E12	100-114
17G12-D5	10-24	52F2-E8	100-114
19H6-A1	10-24	52F6-B3	100-114
19H6-F7	10-24	52F6-F11	100-114
19H6-G8	10-24	56D3-C8	100-114
37D3-H12	10-24	56D3-E9	100-114
37D3-H9	10-24	70B10-B6B2	100-114
37E8-B4	10-24	70B10-B6G12	100-114
37E8-C2	10-24	78E4-D11	100-114
3A4-H4	10-24	78E4-G4	100-114
3H10-E12(A)	10-24	30G1-B2	109-123
3H10-G12	10-24	30G1-C11	109-123
44B7-A9	10-24	49G10-F4	109-123
44B7-B1	10-24	49G10-H1	109-123
54C1-H11	10-24	65B1-A2	109-123
61E7-B11	10-24	65B1-A7	109-123
61H10-B4	10-24	73H6-B8	109-123
61H10-H3	10-24	113F5-A8	109-123
127G7-A5	10-24	113F5-F7	109-123
127G7-E7	10-24	125B11-H3	109-123
115A4-A3	10-24	26C1-B11	118-132
115A4-B1	10-24	26C1-C8	118-132
125B11-B6	10-24	74H10-A3	118-132
73C8-A5	10-24	74H10-C3	118-132
73C8-G4	10-24	78F3-B2	118-132
76B4-D9	10-24	78F3-E7C6	118-132
76B4-H7	10-24	78F3-E7H7	118-132
123E9-B3	19-33	126H12-G6	136-150
15C6-A7	19-33	126H12-H7	136-150
19F8-B1	19-33	22G7-C9	154-168
24A11-D5	19-33	22G7-G9	154-168

(continuación)

Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)	Anticuerpo	Epítopo de Tau (aa)
63H3-B2	19-33	111B8-C4	163-177
63H3-D8	19-33	111B8-F10	163-177
64B9-E11	19-33	66F5-A1	172-177
64B9-F12	19-33	66F5-F2	172-177
45D2-C9	19-33	71H8-A1	190-204
45D2-F4	19-33	71H8-D6	190-204
72E12-B2	19-33	83E10-D10	190-204
72G10-A7	19-33	83E10-D6	190-204
72G10-B6	19-33	126F11-B3	217-231
123E9-A1	19-42	126F11-G11	217-231
19F8-C11	19-42	93A8-C9	397-411
7A11-C12	19-42	93A8-D2	397-411
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		
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		

Para mediciones de afinidad a fITau, se midieron 46 anticuerpos usando SPR en un instrumento Biacore, con las  $K_D$  determinadas. Las mediciones de afinidad de Biacore se realizaron inmovilizando anticuerpos en un chip anti-IgG y usando fITau como analito diana. Los resultados para 32 anticuerpos se muestran en la Tabla 5, con los anticuerpos

5 clasificados basándose su afinidad por fITau. De los anticuerpos medidos para determinar su afinidad por fITau, 22 anticuerpos tenían afinidades superiores a 20 nM, de los cuales 14 anticuerpos tenían  $K_D$  inferiores a 5 nM teniendo el anticuerpo 37D3-H9 una  $K_D$  (afinidad) de 1 nM.

Tabla 5: Afinidad por fITau

Anticuerpo	$K_D$ (nM)	Anticuerpo	$K_D$ (nM)
37D3-H9	1	3A4-H4	7,8
54C1-H11	1,5	52F6-F11	8,4
123E9-A1	1,8	3A4-A12	10,1

(continuación)

Anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)	Anticuerpo	K <sub>D</sub> (nM)
94B2-C1	1,9	44B7-B1	14,7
24A11-D5	2	3H10-E12	19,4
113F5-F7	2,4	10A1-D8	19,6
89F4-A1	2,9	52F2-E8	26
19F8-B1	2,9	19H6-F7	39
61E7-C4	3,3	34H4-F5	43
126F11-G11	4,2	19H6-A1	56
26C1-C8	4,3	34H4-B10	69
93A8-D2	4,3	17G12-C11	118
37E8-B4	4,4	45H12-C4	139
61E7-B11	4,8	17G12-D5	161
125B11-H3	6	61H10-H3	177
54C1-C3	6,8	11E10-C3	399

Para verificar la unión de los anticuerpos seleccionados a las seis isoformas de Tau humana, se realizó una SDS-PAGE con una escalera de Tau recombinante que contenía las seis isoformas y se realizó una transferencia Western (WB) usando tres anticuerpos contra Tau seleccionados. Los tres anticuerpos contra panTau se unen a las seis isoformas de Tau (Figura 3). Adicionalmente, se analizaron simultáneamente homogeneizados de cerebro de tres pacientes con EA y dos controles de la misma edad para su comparación. Como era de esperar, y basándose en los epítopos mapeados, los tres anticuerpos sometidos a ensayo en este ensayo mostraron unión a las seis isoformas de Tau. La diferencia observada en los patrones de bandas entre la EA humana y los donantes de control puede representar la mayor fosforilación y/o los agregados de Tau estables en SDS que se esperaría que estuvieran presentes en los sujetos con EA.

5 Las muestras de la enfermedad de Alzheimer (EA) humana y de control se sometieron además a un ensayo de captura de ELISA no desnaturalizante para verificar la unión a Tau en cerebros humanos. Los lisados de muestras procesados para Tau soluble de dos sujetos con EA y dos sujetos de control sin EA emparejados por edad se analizaron en 8 diluciones sometiendo a ensayo tres anticuerpos (Figura 4A-C).

10 Se determinaron las secuencias de las cadenas variables de los anticuerpos de 27 hibridomas (Antitope, Reino Unido). Las secuencias proteicas de determinados dominios variables de las cadenas pesada y ligera y de las regiones 15 hipervariables (HVR) se muestran en la Tabla de Secuencias.

20 Se determinaron las secuencias de las cadenas variables de los anticuerpos de 27 hibridomas (Antitope, Reino Unido). Las secuencias proteicas de determinados dominios variables de las cadenas pesada y ligera y de las regiones 25 hipervariables (HVR) se muestran en la Tabla de Secuencias.

### Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos anti-Tau

25 Las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se construyeron mediante síntesis génica y subclonación del ADN resultante en vectores de expresión de mamíferos de IgG2a murina (cadena pesada) y kappa murina (cadena ligera). Los anticuerpos se expresaron 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). Los anticuerpos recombinantes purificados se cribaron en cuanto a su unión a la proteína monomérica Tau en un instrumento de resonancia de plasmón superficial Biacore T200 usando un kit de captura de IgG de ratón y un chip 30 CM5 de la serie S. Se capturaron anticuerpos en formato mlgG2a diluidos en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, 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) usando un caudal de 10 µl/min. La unión del monómero Tau 35 en HBSP se controló a 25 °C usando un caudal de 30 µl/min y concentraciones de 16, 31, 63, 125, 125, 250 y 500 nM para los anticuerpos 26C1 y 94B2; 16, 31, 63, 125, 125, 250, 500 y 1000 nM para los anticuerpos 52F6-F11.v1 y 52F6-F11.v2; 6, 19, 56, 56, 167 y 500 nM para los anticuerpos 11E10-B8, 55E7-F11 y 125B11-H3; 5, 16, 49, 148, 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. Los tiempos de 40 asociación y disociación se controlaron durante 180-480 segundos y durante 300-600 segundos, respectivamente. El anticuerpo 37D3-H9 se seleccionó para análisis posteriores debido a su alta afinidad (Tabla 6) y a la ausencia de motivos de glicosilación NXS/T en las CDR.

Tabla 6:  $K_D$  (nM) de anticuerpos murinos contra el monómero de Tau humana. Los datos mostrados representan los resultados de un modelo de unión 1:1.

Anticuerpo	$K_D$ (nM)	$k_{\text{asociación}}$ (1/Ms)	$k_{\text{disociación}}$ (1/s)
26C1	17	$4 \times 10^4$	$7 \times 10^{-4}$
94B2-C1	6	$5 \times 10^4$	$3 \times 10^{-4}$
54C1-H11	0,6	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^{-4}$
3A4-H4	12	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^{-4}$
37D3-H9	1,6	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^{-4}$
19H6-F7	10	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^{-3}$
11E10-B8	108	$5.2 \times 10^5$	$2 \times 10^{-2}$
55E7-F11	171	$2 \times 10^5$	$4 \times 10^{-2}$
125B11-H3	5	$4.5 \times 10$	$3 \times 10^{-4}$
123E9-A1	52	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^{-2}$
30G1-B2	20	$4 \times 10^5$	$8 \times 10^{-3}$
66F5-A1	105	$8 \times 10^4$	$8 \times 10^{-3}$
89F4-A1	27	$3 \times 10^5$	$7 \times 10^{-3}$
93A8-D2	6	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^{-3}$
126F11-G11	3	$2 \times 10^6$	$4 \times 10^{-3}$
52F6-F11.v1	15	$5 \times 10^4$	$7 \times 10^{-4}$
52F6-F11.v2	5	$7 \times 10^4$	$4 \times 10^{-4}$

5    37D3-H9 demuestra avidez cuando se une a la proteína Tau

La proteína Tau monomérica humana se acopló covalentemente a un chip Biacore Series S CM5 usando el kit de acoplamiento de aminas Biacore Amine Coupling Kit (GE Life Sciences), dando como resultado la inmovilización a un nivel de aproximadamente 128 UR. La unión directa de 37D3-H9 en ambos formatos de Fab e IgG se controló usando el formato experimental de cinética de ciclo único con cinco períodos de asociación de 300 s cada uno y concentraciones de anticuerpos de 1, 2, 4, 8 y 16 nM (IgG) o 5, 10, 20, 40 y 80 nM (Fab). La disociación se controló durante 7200 segundos (Fab) o durante 14400 segundos (IgG). Se calculó un valor para la tasa de disociación ajustando un modelo de unión 1:1 a los datos. Las velocidades de disociación calculadas fueron de  $5.0 \times 10^{-4}$  para 37D3-H9 Fab y de  $1, 1 \times 10^{-5}$  para IgG 37D3-H9, una diferencia de 45 veces. La Figura 5 ilustra la diferencia en las tasas de disociación de Fab (panel izquierdo) e IgG (panel derecho), lo que indica que la IgG 37D3-H9 demuestra avidez.

**Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos anti-Tau**

20    El anticuerpo 37D3-H9 se humanizó injertando las CDR del anticuerpo y restos seleccionados de marco de región variable en marcos de consenso de anticuerpos humanos (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), págs. 9-28). Se evaluó el injerto en marcos de VH3, Vk2 y Vk1 de consenso. El injerto de cadena pesada incluía un resto murino en la posición 49 (sistema de numeración de Kabat). El injerto Vk2 incluía restos murinos en las posiciones marco 2 y 4. El injerto Vk1 incluía restos murinos en las posiciones marco 2, 4 y 43. Se construyeron variantes humanizadas mediante síntesis génica y subclonación en vectores de expresión de mamíferos de IgG1 o IgG4 y cadena Kappa humanas. Los anticuerpos se expresaron por cotransfección de los plásmidos de cadena pesada y ligera en células CHO y se purificaron con resina de afinidad MabSelect Sure. Las variantes humanizadas se cribaron en cuanto a su afinidad por el monómero de Tau humana usando el kit de captura de IgG humana Biacore, un chip CM5 de la serie S y un instrumento Biacore T200. Los anticuerpos se diluyeron a 2  $\mu$ g/ml y se capturaron durante 15 segundos a 10  $\mu$ l/min. La asociación y disociación de monómero de Tau humana 100, 33, 11 y 3,7 nM en HEPES 10m M pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) se controló durante 180 segundos y 600 segundos, respectivamente, a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Se aplicó a los resultados un modelo de unión 1:1 (Tabla 7).

Tabla 7: Cribado de afinidad de variantes humanizadas para Tau humana monomérica

Variante de anticuerpo	Marco 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
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

Las variantes de anticuerpos hu37D3-H9.v1, hu37D3-H9.v2, hu37D3-H9.v5 y hu37D3-H9.v6 se caracterizaron adicionalmente por resonancia de plasmón superficial con concentraciones adicionales de anticuerpos y tiempos de asociación/disociación más largos. Estas variantes se analizaron con un intervalo más amplio de concentraciones de monómeros de Tau humana (1,2, 3,7, 11,1, 11,1, 33,3, 100 nM) y períodos de asociación (300 segundos) y disociación (1200 segundos) mayores. Se aplicó a los resultados un modelo de unión 1:1 (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis detallado de la cinética de unión de variantes seleccionadas a Tau humana mediante resonancia de plasmón superficial

Variante de anticuerpo	Marco de 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) a determinados anticuerpos IgG4. Se ha descrito que mutaciones del dominio de unión del receptor de Fc-neonato (FcRn), tales como M252Y, S254T y T256E (YTE), aumentan la unión de FcRn y, por tanto, la semivida de los anticuerpos. Véase la Solicitud de patente publicada de los EE.UU. N.º 2003/0190311 y Dall'Acqua *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524 (2006).

5 El anticuerpo 125B11-H3 se humanizó en los marcos de consenso VH3 y Vk1. El injerto de cadena pesada incluía restos murinos en la posición 78 (sistema de numeración de Kabat). El injerto Vk1 incluía restos murinos en las 10 posiciones marco 43 y 87. La cadena ligera de 113F5-F7 también se humanizó en el marco Vk1, con restos murinos adicionales en las posiciones de marco 43 y 87. Las variantes humanizadas de cadenas pesadas (125B11) y cadenas 15 ligeras (125B11 y 113F5-F7) se cotransfectaron en múltiples combinaciones y se purificaron en formato de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente. Después, las variantes humanizadas se cribaron en cuanto a su afinidad por el monómero de Tau humana usando el kit de captura de IgG humana Biacore, un chip CM5 de la serie S y un instrumento Biacore T200. Los anticuerpos se diluyeron a 2  $\mu$ g/ml y se capturaron durante 15 segundos a 10  $\mu$ l/min. La asociación y disociación de monómero de Tau humano 0, 100 y 500 nM en HBSP se monitorizó durante 180 s y 300 s respectivamente a un caudal de 40  $\mu$ l/min. Se aplicó a los resultados un modelo de unión 1:1 (Tabla 9).

Tabla 9: Cribado de las variantes de humanización 125B11-H3 y 113F5-F7 mediante resonancia de plasmón superficial

$K_D$ de cribado (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	-*
	LC3	21	23	20	15	-
	LC4	23	22	20	17	> 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.

NE, no sometido a ensayo.

15 Se seleccionaron las variantes hu125B11.v17 (HC3+LC1), hu125B11.v26 (HC4+LC2) y hu125B11.v28 (HC4+LC4) para su análisis cinético de alta resolución basado en el cribado por afinidad (Tabla 10). El anticuerpo 94B2-C1 se humanizó en los marcos VH1 y Vk2. El injerto de cadena pesada también incluía restos murinos en las posiciones 28, 29, 67, 69, 71 y 73 (sistema de numeración de Kabat). El injerto Vk2 también incluía restos murinos en las posiciones 10 marco 2, 36 y 46. Se expresaron combinaciones de ocho cadenas pesadas y ocho cadenas ligeras, se purificaron y 15 se cribaron mediante resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) como se ha descrito anteriormente para 125B11. Los resultados del cribado por SPR se muestran en la Tabla 11. Se seleccionó la variante hu94B2.v105 (variante de cadena pesada 94B2.HC1, variante de cadena ligera 94B2.LC13) para una caracterización 20 por SPR detallada (Tabla 11).

25 Tabla 10: Datos cinéticos para variantes de anticuerpos humanizados anti-Tau seleccionadas

Anticuerpo	Isotipo	$K_D$ (nM)	$k_{\text{asociación}}$ (1/Ms)	$k_{\text{disociación}}$ (1/s)
hu125B11.v17	hlgG1	10,5	$0,8 \times 10^5$	$0,8 \times 10^{-3}$
hu125B11.v26	hlgG1	9,5	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^{-3}$
hu125B11.v28	hlgG1	10,2	$0,7 \times 10^5$	$0,7 \times 10^{-3}$
hu94B2.v105	hlgG1	3,7	$0,8 \times 10^5$	$0,3 \times 10^{-3}$

Tabla 11: Cribado de variantes de humanización 94B2 mediante resonancia de plasmón superficial

$K_D$ de cribado (nM)	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	NE	99,6	§
	HC3	2,0	§	69,3	§	3,8	§	64,1	§

(continuación)

K <sub>D</sub> de cribado (nM)	Variante de humanización de cadena ligera 94B2:							
	LC9	LC10	LC11	LC12	LC13	LC14	LC15	LC16
HC	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 a monómero de Tau observada.  
NE, no sometido a ensayo.

**Ejemplo 5: Análisis de estabilidad de anticuerpos anti-Tau humanizados**5 *Identificación de la inestabilidad química*

Se sometieron a estrés térmico muestras de anticuerpos para imitar la estabilidad durante la vida útil del producto. Las muestras se intercambiaron en tampón de acetato 20 mM, pH 5,5, o tampón de fosfato, pH 7,4, y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml. Un ml de muestra se estresó a 40 °C durante 2 semanas y un segundo se almacenó a -70 °C como control. Después, ambas muestras se dirigieron usando tripsina para crear péptidos que pudieran analizarse usando cromatografía de líquidos (CL) - espectrometría de masas (EM). Para cada péptido de la muestra se adquirió el tiempo de retención de la LC, así como la masa exacta de alta resolución y la información de fragmentación de iones peptídicos (información de la secuencia de aminoácidos) en la MS. Se tomaron cromatogramas de iones extraídos (XIC) para los péptidos de interés (iones de péptidos nativos y modificados) de los conjuntos de datos en una ventana de ±10 ppm y se integraron los picos para determinar el área. Los porcentajes relativos de modificación se calcularon para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividido por (área del péptido modificado más el área del péptido nativo) multiplicado por 100. Después, estos porcentajes relativos se compararon entre las muestras de control (t = 0) y las estresadas (t = 2 semanas). Los porcentajes mostrados representan el valor de control (t = 0) restado del valor estresado (t = 2 semanas). El análisis de desamidación de los anticuerpos hu37D3-H9.v1 y hu37D3-H9.v5 permitió observar que la secuencia N<sup>28</sup>G<sup>29</sup>N<sup>30</sup> (numeración de Kabat) dentro de la CDR-1 de la cadena ligera era susceptible de desamidación. El aumento de N<sup>28</sup>G<sup>29</sup>N<sup>30</sup> desamidada fue del 16,5 % para hu37D3-H9.v1 y del 11 % para hu37D3-H9.v5.

*Repercusión de la desamidación en la unión del anticuerpo al antígeno*

25 Para evaluar el impacto de la N<sup>28</sup> desamidación en la afinidad por la Tau humana, fue deseable obtener dos muestras con estados de desamidación N<sup>28</sup> muy separados. hlgG4 Hu37D3-H9.v5. S228P se incubó a 40 °C durante dos semanas a una concentración de 1 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. La desamidación del motivo N<sup>28</sup>G<sup>29</sup> se midió mediante LC-MS/MS. La muestra estresada t = 2 semanas tenía un aumento de la desamidación del 43,1 % con respecto a la muestra no estresada t = 0. Los anticuerpos estresados y no estresados se analizaron para determinar la unión de Tau mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore) usando el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Las hlgG se diluyeron a 2 µg/ml en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) y se capturó a un caudal de 10 µl/min durante 15 segundos (muestra t0) o 17 segundos (muestra t2). Se recogieron datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a concentraciones de 0, 3,1, 6,3, 12,5, 25, 25, 50 y 100 nM en HBSP, usando un caudal de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 s y una fase de disociación de 1800 s. Entre los ciclos, la superficie se regeneró mediante una inyección de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a 10 µl/min. Un modelo de unión 1:1 se ajustó a los datos usando los valores predeterminados del instrumento, incluyendo el ajuste local del parámetro "RI". Los resultados mostrados en la Figura 6 y en la Tabla 12 demuestran que, aunque el anticuerpo estresado se inmovilizó a niveles mayores que el anticuerpo no estresado en este experimento, la magnitud de la señal de unión a Tau (representada por la magnitud del parámetro Rmáx) era notablemente inferior. Después de normalizar el valor de Rmáx para las diferencias en el nivel de captura, la muestra estresada (t = 2 semanas) parecía mostrar aproximadamente la mitad de la capacidad total de unión a Tau que la muestra no estresada (indicado por una reducción del 56 % en la Rmáx Normalizada). La afinidad calculada no parece haber cambiado: en este análisis, la diferencia de K<sub>D</sub> entre las muestras t = 0 y t = 2 semanas fue inferior al 2 % (K<sub>D</sub> = 0,7 nM para t = 0 y t = 2 semanas). Los resultados concuerdan con que la muestra t = 2 semanas contiene una población significativamente reducida de anticuerpos de alta afinidad.

Tabla 12: Unión relativa de muestras de hu37D3-H9.v5 estresadas y no estresadas a Tau monomérica mediante resonancia de plasmón superficial

Muestra de hIgG4.S228P hu37D3-H9.v5	Nivel de ligando (UR)	Rmáx (UR)	Rmáx normalizada (= Rmáx / Nivel de ligando)	Cambio en Rmáx normalizada
Control (t = 0)	102,9	47,7	0,46	N/A
Estresado (t = 2 semanas)	146,8	30,2	0,21	- 56 %

*Repercusión de la desamidación en la unión del anticuerpo al antígeno y cálculo de "Rmáx normalizada"*

- 5 Dado que se espera que la desamidación de la asparagina dé como resultado productos de ácido aspártico y ácido iso-aspártico (Bischoff R. y Kolbe H.V.J. (1994). *J. Chromat.* 5, 662, p261-278) se analizó la repercusión del reemplazo de N<sup>28</sup> por D<sup>28</sup> (variante hu37D3-H9.v5 N28D) en la afinidad por el monómero de Tau humana. La afinidad se evaluó a 25 °C usando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Las 10 hIgG se diluyeron a 2 µg/ml en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) y se capturó a un caudal de 10 µl/min durante 22 segundos. Se recogieron 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, usando un caudal de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre los 15 ciclos, la superficie se regeneró mediante una inyección de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a 10 µl/min. Un modelo de unión 1:1 se ajustó a los datos y se calcularon las afinidades para hu37D3-H9.v5 y hu37D3-H9.v5.3 (también denominado en este documento hu37D3-H9.v5 N28D) usando un análisis cinético. Los parámetros utilizados para el ajuste 1:1 incluían el ajuste local por defecto del Instrumento para el parámetro "RI". Los resultados se muestran en la Figura 7 y la Tabla 13.
- 20 El K<sub>D</sub> calculado para la variante hu37D3-H9.v5 N28D fue de  $160 \times 10^{-9}$  M, en comparación con  $1,5 \times 10^{-9}$  M (media, n = 4 determinaciones intra-experimento) para hu37D3-H9.v5 analizado en las mismas condiciones. Por lo tanto, la 25 conversión de N<sup>28</sup> en D<sup>28</sup> provoca una reducción > 100 veces mayor de la afinidad. Dada la afinidad comparativamente baja de la variante hu37D3-H9.v5 N28D, y la cinética comparativamente rápida, se razonó que el análisis cinético de una mezcla de las variantes N<sup>28</sup> y D<sup>28</sup> estaría dominado por la población de mayor afinidad, y que la presencia de las 30 variantes de menor afinidad podría reflejarse en una reducción de la Rmáx 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 en cantidades iguales. En comparación con hu37D3-H9.v5 solo, una mezcla 1:1 de hu37D3-H9.v5 y hu37D3-H9.v5 N28D dio como resultado una reducción del 45 % de la Rmáx normalizada (Tabla 13). Se concluyó que los cambios en la Rmáx normalizada tras el estrés térmico pueden ser indicativos de una población reducida de anticuerpos de alta afinidad en la muestra estresada. Por lo tanto, se pensó que los cambios en la Rmáx normalizada podrían usarse para cribar variantes de hu37D3-H9 con el fin de mejorar su estabilidad.

35 Tabla 13: Cambios en la Rmáx normalizada observados tras el estrés térmico de hu37D3-H9.v5 y tras la mezcla de hu37D3-H9.v5 con el producto de desamidación previsto hu37D3-H9.v5 N28D

Muestra	K <sub>D</sub> (nM)	Rmáx (UR)	Disminución de la Rmáx normalizada en comparación con la referencia*	Comentarios
hu37D3-H9.v5 hIgG1	$1,5 \pm 0,2$	$76,1 \pm 0,4$	Referencia	Media +/- Desviación estándar de cuatro análisis intra-experimentales
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 la muestra estresada
hu37D3-H9.v5 hIgG4. S228P, t = 2 semanas	1,5	33,4	54 %	Muestra estresada

\*Rmáx normalizada = Rmáx (UR) / Nivel de ligando (UR). Rmáx normalizada para el anticuerpo de referencia = 0,33 (media de cuatro determinaciones intra-experimentales, desviación estándar < 0,01).

*Optimización y selección de anticuerpos*

Se evaluaron noventa variantes de 37D3-H9 por Biacore para comparar su estabilidad funcional con o sin un período de estrés térmico de dos semanas a 40 °C. Las variantes incluían la mayoría de las mutaciones únicas del motivo N<sup>28</sup>G<sup>29</sup>N<sup>30</sup>T<sup>31</sup>, mutantes dobles que contenían la mutación de G29A, mutaciones dobles de Asn-28 y Tyr-32 que podrían reemplazar funcionalmente estos restos por enlaces de hidrógeno, así como todas las permutaciones posibles de los restos 2, 4, 33 y 93, ya sean los restos presentes en el anticuerpo 37D3-H9 original o la variante de resto de estirpe germinal correspondiente. Además, las mutaciones se sometieron a ensayo en el contexto de que el resto 1 fuera Asp o Glu, lo que no influye en la afinidad o estabilidad del resto Asn-28.

Los anticuerpos se expresaron mediante transfección transitoria de células Expi293 en formato de 96 pocillos y purificación automatizada realizada en un sistema de manipulación de líquidos Tecan freedom EVO 200 con un cabezal MCA96 de 500 µl. Brevemente, se capturaron IgG en 1 ml de cultivo usando columnas de punta que se empaquetaron a medida con 20 µl de resina MabSelect SuRe (Glygen Corp & GE Healthcare). Después de lavar con 1X PBS pH 7,4, las IgG se eluyeron en 160 µl de ácido fosfórico 50 mM pH 3 y se neutralizaron con 12 µl de PBS 20X pH 11. Las columnas de punta MabSelect SuRe se separaron en NaOH 0,1 M y se regeneraron con PBS 1X pH 7,4 para un uso consecutivo de hasta 15 veces. Los anticuerpos purificados en formato de 96 pocillos se normalizaron a 0,1 mg/ml usando un robot de manipulación de líquidos Hamilton Star. Las muestras "pre-estrés" se mantuvieron a aproximadamente 4 °C y las muestras "post-estrés" se incubaron a 40 °C durante dos semanas en una máquina de PCR. La estabilidad funcional de las variantes se comparó realizando experimentos cinéticos de resonancia de plasmón superficial con las preparaciones de anticuerpos "pre-estrés" y "post-estrés". Los anticuerpos se evaluaron usando un chip de captura de anticuerpos humanos CM5 Serie S generado con el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un instrumento Biacore T200. Los anticuerpos diluidos a 2 µg/ml se inmovilizaron usando un tiempo de inyección de 15 segundos y un caudal de 10 µl/min. La unión al monómero de Tau a 0 nM, 26,5 nM y 265 nM, a 25 °C, usando un caudal de 40 µl/min, se controló durante una fase de asociación de 180 segundos seguida de una fase de disociación de 300 segundos. Las muestras se analizaron en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (HBSP) usando un formato de cinética multiciclo. Los datos se analizaron usando el programa informático Diva, ajustando un modelo de unión 1:1. Los valores de afinidad resultantes (K<sub>D</sub>) se muestran en la Figura 8A-D. También se calculó un índice de estabilidad, usando el razonamiento de que se espera que los anticuerpos con afinidad comprometida (debido, por ejemplo, a la desamidación de restos clave) contribuyan igualmente al nivel de captura de IgG ("Nivel de ligando") pero contribuyan menos a la unión medida de Tau, y que esto se refleje en el valor derivado experimentalmente para Rmáx. Para tener en cuenta las variaciones en la cantidad de cada anticuerpo capturado, Rmáx se normalizó para el nivel de captura de anticuerpos (medido por "Nivel de ligando", Unidades de Respuesta inmovilizadas durante la captura de anticuerpos). Por lo tanto, la Rmáx Normalizada se calcula como la Rmáx experimental (unidades = UR) dividida por el "Nivel de ligando" (Resultado de Evaluación que representa las UR capturadas durante la etapa de captura de hIgG, unidades = RU) y el Índice de Estabilidad se calcula en el presente documento como Rmáx normalizada (post-estrés) dividida por Rmáx normalizada (pre-estrés).

Los anticuerpos seleccionados se expresaron mediante transfección transitoria de células CHO y se purificaron. Despues, los anticuerpos se estresaron durante dos semanas a 1 mg/ml y la desamidación se analizó mediante LC-MS/MS, usando el mapeo de péptidos trípticos RCM con reducción de DTT, protegiendo terminalmente con IAA y digestión a pH 8,2. Los resultados (Tabla 14) demostraron que la variante hu37D3-H9.v28.A4 tenía una susceptibilidad reducida a la desamidación en el motivo N<sup>28</sup>G<sup>29</sup>N<sup>30</sup>. La desamidación reducida de la hu37D3-H9.v28.A4 fue inesperada, ya que el resto no se ubica en la vecindad inmediata del resto Asn-28 (Figura 9) y no está claro cómo la mutación F33L podría estabilizar Asn-28.

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

Anticuerpo		Condiciones de estrés térmico	Aumento de la desamidación de N <sup>28</sup> G <sup>29</sup> N <sup>30</sup> de cadena ligera
hu37D3-H9.v1	hIgG1	40 °C en Tampón de acetato, pH 5,5	16,5 %
hu37D3-H9.v5	hIgG1	40 °C en Tampón de acetato, pH 5,5	11 %
hu37D3-H9.v28.A4	hIgG1	40 °C en Tampón de acetato, pH 5,5	N <sup>28</sup> : 2,8 % N <sup>30</sup> : 0,2 %
		37 °C en PBS pH 7,4	N <sup>28</sup> : 5,3 % N <sup>30</sup> : ND
	hIgG4.S228P.YTE	40 °C en Tampón de acetato, pH 5,5	N <sup>28</sup> : 0 % N <sup>30</sup> : 0 %
		37 °C en PBS pH 7,4	N <sup>28</sup> : 10,4 % N <sup>30</sup> : 2,0 %

**Ejemplo 6: Selección y caracterización de anticuerpos anti-Tau humanizados***Selección y caracterización de anticuerpos: unión a la proteína Tau humana*

- 5 La afinidad de los anticuerpos seleccionados se evaluó a 25 °C usando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Las hlgG se diluyeron a 0,25 µg/ml en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) y se capturó a un caudal de 10 µl/min durante 150 segundos. Se recogieron 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, usando un caudal de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre los ciclos, la superficie se regeneró usando dos inyecciones secuenciales de 30 segundos de MgCl 3 M a 10 µl/min. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 (Tabla 15).
- 10

Tabla 15: Datos cinéticos para variantes de anticuerpos humanizados anti-Tau seleccionadas

Anticuerpo	Isotipo	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>asociación</sub> (1/Ms)	k <sub>disociación</sub> (1/s)
hu37D3-H9.v28.A4	hlgG1	1,5	6,9 × 10 <sup>5</sup>	1,1 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3-H9.v5	hlgG1	1,0	7,5 × 10 <sup>5</sup>	0,8 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3-H9.v5	hlgG4.S228P	1,3	7,1 × 10 <sup>5</sup>	0,9 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3-H9.v1	hlgG4.S228P	2,0	6,7 × 10 <sup>5</sup>	1,3 × 10 <sup>-3</sup>

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

La afinidad se evaluó a 25 °C usando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de FAb humano GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Las hlgG se diluyeron a 0,5 µg/ml en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) y se capturó a un caudal de 10 µl/min durante 180 segundos. Se recogieron 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, usando un caudal de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre los ciclos, la superficie se regeneró usando dos inyecciones secuenciales de 60 segundos de Glicina 10 mM pH 2,1. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1. Los datos cinéticos se muestran en la Tabla 16.

- 25 Tabla 16: Cinética de unión de hu37D3-H9.v28.A4 hlgG4.S228P.YTE a Tau humana monomérica mediante resonancia de plasmón superficial

Anticuerpo	Preparación de anticuerpos	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>asociación</sub> (1/Ms)	k <sub>disociación</sub> (1/s)
hu37D3-H9.v28.A4	Prep 1	1,4	6 × 10 <sup>5</sup>	9 × 10 <sup>-4</sup>
hlgG4.S228P.YTE	Prep 2	1,4	6 × 10 <sup>5</sup>	9 × 10 <sup>-4</sup>

*Caracterización de anticuerpos: Unión a proteína Tau de macaco cangrejero*

30 La afinidad se evaluó a 25 °C usando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de IgG humana GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Las hlgG se diluyeron a 2 µg/ml en HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 % (tampón de funcionamiento, HBSP) y se capturó a un caudal de 10 µl/min durante 15 segundos. Se recogieron datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a un mínimo de cinco concentraciones diferentes distintas de cero entre 1,2 y 100 nM, con una concentración repetida. La cinética se evaluó usando un caudal de 30 µl/min, una fase de asociación de 300 segundos y una fase de disociación de 600 segundos. Entre los ciclos se realizó una inyección de regeneración de 30 segundos de cloruro de magnesio 3 M a un caudal de 10 µl/min. Los resultados se ajustaron a un modelo de unión 1:1. Los datos cinéticos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Afinidad de los anticuerpos anti-Tau humanizados por la Tau monomérica de macaco cangrejero

Anticuerpo	Nivel de ligando (UR)	Rmáx (UR)	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>asociación</sub> (1/Ms)	k <sub>disociación</sub> (1/s)
hu37D3.v28.A4	113,9	62,6	0,7	17 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3.v28.F1	126,9	61,2	1,3	12 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3.v28.A12	162,6	85,2	1,0	17 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3.v29.2	168,6	86,0	1,4	17 × 10 <sup>5</sup>	2 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3-H9.v5	125,1	55,5	0,6	15 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>
hu37D3-H9.v1	130,2	51,7	0,8	20 × 10 <sup>5</sup>	1 × 10 <sup>-3</sup>

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

**Ejemplo 7: Farmacocinética del anticuerpo anti-Tau**

5 Para evaluar la farmacocinética del anticuerpo mlgG2a 37D3-H9 anti-Tau *in vivo*, se administró a ratones C57BL/6 una única inyección en embolada intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP) a una dosis de 10 mg/kg a ratones conscientes. En diversos puntos temporales hasta 28 días después de la dosis, se recogieron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-Tau.

10 Las concentraciones del anticuerpo dosificado en plasma de ratón se midieron con un ELISA genérico usando una capa de anticuerpo anti-mlgG2a de ratón, seguido de la adición de muestras de plasma comenzando con una dilución de 1:100 y terminando con la adición de un conjugado de ratón anti-mlgG2a-biotina, y después estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante para la detección. El ensayo tenía un intervalo de curva patrón 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 se notificaron 15 como menos que notificables (LTR, por sus siglas en inglés).

La Figura 10 muestra los resultados del análisis farmacocinético para mlgG2a 37D3-H9 anti-Tau. mlgG2a 37D3-H9 anti-Tau tuvo una exposición y un aclaramiento similares en ratones C57BL/6 de tipo silvestre que los anticuerpos de control de isotipo, con un aclaramiento de 6,31 ml/día/kg.

20 Para evaluar la farmacocinética de mlgG2a 94B2-C1 anti-Tau y mlgG2a 125B11-H3 anti-Tau *in vivo*, se administró una única inyección IP en embolada del anticuerpo a una dosis de 10 mg/kg a ratones C57BL/6 conscientes. En diversos puntos temporales hasta 28 días después de la dosis, se recogieron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-Tau.

25 Las concentraciones del anticuerpo dosificado en plasma de ratón se midieron con un ELISA genérico usando una capa de anticuerpo anti-mlgG2a de ratón, seguido de la adición de muestras de plasma comenzando con una dilución de 1:100 y terminando con la adición de un conjugado de ratón anti-mlgG2a-biotina, y después estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante para la detección. El ensayo tenía un intervalo de curva patrón de 0,78-100 ng/ml y un límite de detección de 0,078 µg/ml. Las concentraciones también se midieron con un ELISA específico usando Tau recombinante como la capa, seguido de la adición de muestras de plasma comenzando con una dilución de 1:10, y finalizado con la adición de anti-mlgG2a de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante para la detección. El ensayo tenía un intervalo de curva patrón 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 se notificaron como menos que notificables (LTR, por sus siglas en inglés).

30 Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 16 y 17. mlgG2a 94B2 anti-Tau tuvo una exposición y un aclaramiento similares en ratones C57BL/6 de tipo silvestre que un anticuerpo de control de isotipo cuando se analizaron las concentraciones usando un ensayo genérico, pero una menor exposición y un aclaramiento más rápido 35 cuando las concentraciones se analizaron usando un ensayo específico. Véase la Figura 16. El aclaramiento determinado mediante el ensayo genérico fue de 4,06 ml/día/kg y el determinado mediante el ensayo específico fue de 7,53 ml/día/kg. Estos resultados sugieren que el anticuerpo puede experimentar cambios *in vivo* a lo largo del tiempo que comprometan su capacidad para reconocer su diana. mlgG2a 125B11-H3 anti-Tau tuvo una exposición y un aclaramiento similares en ratones C57BL/6 de tipo silvestre como anticuerpo de control de isotipo, independientemente del ensayo que generó las concentraciones. Véase la Figura 17. El aclaramiento determinado mediante el ensayo genérico es de 4,96 ml/día/kg y el determinado mediante el ensayo específico es de 4,90 ml/día/kg.

40 La Tabla 18 muestra los parámetros farmacocinéticos para los anticuerpos 37D3-H9, 94B2-C1 y 125B11-H3 anti-Tau en ratones.

45

50 Tabla 18: Parámetros farmacocinéticos para anticuerpos anti-Tau

	Vía de administración	Ensayo	Cmáx (µg/ml)	ABCinf (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

55 Para evaluar la farmacocinética de los anticuerpos hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 *in vivo*, a macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) se les administró una única inyección IV en embolada a una

dosis de 1 mg/kg a monos conscientes. En diversos puntos temporales hasta 49 días después de la dosis, se recogieron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-Tau.

5 Las concentraciones del anticuerpo dosificado en el plasma de mono se midieron con un ELISA genérico usando una capa de anticuerpo anti-IgG humana de oveja, seguido de la adición de muestras de plasma comenzando con una dilución de 1:100, y finalizado con la adición de anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante para la detección. El ensayo tenía un intervalo de curva patrón 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 se notificaron como menores que notificables (LTR, por sus siglas en inglés).

10 10 La Figura 11 muestra los resultados del análisis farmacocinético para hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4. En la Figura 11, cada conjunto de puntos de datos representa un animal y las líneas representan el promedio de todos los animales del grupo de anticuerpos y ensayo. La Tabla 19 muestra los parámetros farmacocinéticos para hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en macacos cangrejeros.

15 15 Tabla 19: Parámetros farmacocinéticos de hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en macacos cangrejeros

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

20 20 **Ejemplo 8: Caracterización epitópica adicional del anticuerpo anti-Tau**

Después de una comparación de la unión de 37D3-H9 al monómero de Tau biotinilado y al péptido biotinilado (MAPT\_10-24), 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 a 2 µg/ml en tampón de carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6. Todas las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo Superblock™ (PBS) (Thermo Fisher Scientific) durante dos horas y, después, se lavaron minuciosamente con PBS, polisorbato 20 al 0,05 %. Despues, los pocillos se expusieron a péptidos Tau biotinilados (Tabla 20) o al monómero de Tau biotinilado Avi-tag a 1 µg/ml durante una hora y se lavaron como anteriormente. Se sintetizaron péptidos usando química Fmoc en fase sólida estándar (véase, por ejemplo, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*; Chan, W. C., White, P. D., Eds.; Oxford University

30 Press: Nueva York, 2000). A los anticuerpos mlgG2a 37D3-H9 y hlgG1 hu37D3-H9.v5, diluidos en serie de 500 nM a 50 pM en tampón de bloqueo Superblock™ (PBS) al 90 %, se les permitió unirse a los pocillos recubiertos con Tau biotinilada durante 90 minutos. Los pocillos se lavaron como anteriormente y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Invitrogen / Life Technologies) diluido 1/1000 en tampón de bloqueo Superblock™ (IgG de conejo antiratón o IgG de cabra antihumana (H+L), respectivamente). Despues de veinte minutos, los pocillos se lavaron como anteriormente y se reveló la señal con TMB Microwell Substrato de 2 componentes (KPL). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de ácido fosfórico 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de placas SpectraMax M2.

35 35 Tabla 20: Secuencias peptídicas

Secuencia de MAPT	Secuencia peptídica	SEQ ID NO:
MAPT(10-24)	VMEDHAGTYGLGDRK	592
MAPT(2-24)	AEPRQEFEV рMEDHAGTYGLGDRK	593
MAPT(2-34)	AEPRQEFEV рMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQD	594
MAPT(10-44)	VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGLTDAGLK	595

40 40 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 12. 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 una 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 una fuerte unión al fragmento 19-33, mientras que el anticuerpo 89F4-A1 mostró una fuerte unión a los fragmentos 28-42 y 37-51. Véase la Figura 12A. Los anticuerpos mlgG2a 37D3-H9 y hlgG1 hu37D3-H9.v5 mostraron ambos una fuerte unión a los fragmentos 2-24 y 2-34 de Tau y una unión más débil al fragmento 10-24. Véanse las Figuras 12B y 12C. Estos resultados sugieren que los anticuerpos mlgG2a 37D3-H9

5 y hlg1 hu37D3-H9.v5 se unen a un epítopo de Tau dentro de los aminoácidos 2-24 de la proteína madura.

10 En un experimento de sustitución por 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 contacta con estos restos de Tau. Usando una serie de péptidos compensados de 15 monómeros, se descubrió que el anticuerpo murino 37D3-H9 mostraba una unión similar al fragmento 9-23 que al fragmento 10-24, y también mostraba una unión moderada a los fragmentos 7-21, 8-22 y 11-25.

15 **Ejemplo 9: Caracterización a base de células de anticuerpos humanizados 37D3-H9**

20 **Métodos**

25 *Cultivo primario de hipocampo y microglía y cocultivo hipocampo-microglía*

30 Se prepararon neuronas de hipocampo primarias disociadas a partir de ratones C57BL/6N de tipo silvestre del día 16-17 embrionario. Las células se colocaron en portaobjetos de 8 pocillos recubiertos con PDL/laminina (Biocoat, 354688 Corning) a 25.000 células/pocillo. Las células se sembraron y mantuvieron en NbActiv4 (BrainBits) y la mitad del medio se reemplazó dos veces por semana. La tau recombinante y los anticuerpos se aplicaron al cultivo a las 18 divisiones celulares.

35 Para el cultivo de microglía, se disociaron las cortezas y los hipocampos de ratones C57BL/6N el día 1-2 postnatal y se cultivaron en FBS al 10 % en DMEM en matraces de cultivo de 225 mm<sup>2</sup> durante 10-12 días. Los matraces de cultivo se agitaron suavemente para disociar la microglía y las células en FBS al 10 % en DMEM se volvieron a sembrar en portaobjetos de cámara de 8 pocillos recubiertos de PDL/laminina a 30.000 células/pocillo para la obtención de imágenes o en placas de 48 pocillos sin recubrir (3548, Corning) a 100.000 células/pocillo para el ensayo de citocinas. 4-5 horas después de la siembra, las células se cambiaron a DMEM exento de suero y con bajo contenido de glucosa y se mantuvieron durante la noche antes del tratamiento con tau recombinante y anticuerpos.

40 Los cocultivos hipocampo-microglía se prepararon replicando microglía disociada de matraces de cultivo de 225 mm<sup>2</sup> sobre neuronas de hipocampo primarias 18 DIV en cámaras de portaobjetos de 8 pocillos (12.500 microglías y 25.000 neuronas por pocillo). Los cocultivos se trataron con tau recombinante y anticuerpos 4 horas después de la siembra de microglía.

45 *Tratamiento in vitro de tau recombinante y anticuerpos*

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

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

60 *Inmunocitoquímica, formación de imágenes y cuantificación*

65 Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 15 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS durante 10 minutos. Se usó suero de burro al 10 % para el bloqueo y las células se incubaron con anticuerpos primarios en PBS durante la noche a 4 °C, seguido de incubación con anticuerpos secundarios marcados con Alexa-fluoróforo contra las especies apropiadas desarrolladas en burro (Invitrogen). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-tau (DAKO), anti-tau humana de conejo desarrollado contra la región N-terminal de tau humana que abarca los aminoácidos 11-24, anti-MAP2 (ab5392, Abeam) y anti-Iba-1 (ab5076, Abeam). Los portaobjetos se montaron con Prolong Gold DAPI (P36935, Invitrogen) y cubreobjetos n.º 1.

70 La formación de imágenes fluorescentes confocales se realizó con un LSM780 (Carl Zeiss, Inc.) usando el software Zen 2010 (Carl Zeiss, Inc.). Para la obtención de imágenes de cultivos de hipocampo y cocultivos de hipocampo y microglía, se recogieron 5 imágenes de apilamiento z a intervalos de 0,98 µm usando lentes de objetivo Plan Apochromat 20x/0,8 M27. Para el ensayo de fragmentación de MAP2, se creó una proyección z de intensidad máxima para la pila de imágenes y se analizó usando Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Para reducir el ruido se usó un filtro mediano y la deconvolución del vecino más próximo. Las longitudes de las neuritas y de los cuerpos

celulares se analizaron usando el módulo de crecimiento de neuritas seguido de un procesamiento morfológico. Los fragmentos de menos de 15 píxeles (6,225  $\mu\text{m}$ ) se normalizaron con respecto a la longitud total de la señal para obtener una medida de la fragmentación de MAP2.

- 5 Se obtuvieron imágenes de la microglía con un objetivo  $\alpha$ -Plan Apochromat 100x/1,46 M27. La cuantificación de la captación de tau recombinante en las células se realizó con Image J (1.43u, 64 bits, National Institute of Health). Los ROI del área celular se dibujaron manualmente usando la señal Iba-1 como referencia. Se midieron el área y la intensidad integrada de la inmunoreactividad de tau de la ROI para obtener la inmunoreactividad de tau normalizada al área. Todos los análisis se realizaron sin tener en cuenta las condiciones experimentales.

10

### Resultados

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 13. Como se muestra en la Figura 13A, los anticuerpos con plena función efectora no protegieron contra la toxicidad de Tau en los cocultivos de neurona-microglía. La Figura 13B muestra imágenes de cocultivos de neurona-microglía en contacto con Tau oligomérica y anticuerpos (paneles inferiores). Los anticuerpos hlgG4 37D3-H9 y hlgG1 hu37D3-H9 (N297G), que carecen de función efectora, fueron protectores frente a la toxicidad de Tau, mientras que hlgG1 37D3-H9, no.

15 20 **Ejemplo 10: Reducción dependiente de la dosis de la patología de Tau en ratones Tg para Tau a los que se administró IgG2a 37D3-H9 o IgG2a 37D3-H9 DANG**

25 Se mantuvieron ratones transgénicos que expresaban Tau P301L humana bajo el promotor Thy1 (Tau P301L-Tg) en un entorno de C57BL/6N (Charles River). Los ratones Tau P301L-Tg y los ratones de camada de tipo silvestre se asignaron a grupos de tratamiento y se dosificaron una vez por semana por vía intraperitoneal (i.p.) con IgG2a-control (anti-gp120) a 30 mg/kg, IgG2a TS 37D3-H9 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 las mutaciones D265A/N297G en IgG2a, que anulan la función efectora. Todas las soluciones de dosificación de anticuerpos se prepararon en histidina 10 mM pH 5,8, sacarosa al 6 %, Tween 20 al 0,02 % a una concentración de 10 mg/ml. El tratamiento comenzó a las 13 semanas de edad. Los grupos de ratones del estudio *in vivo* eran machos y estaban escalonados en 3 cohortes. Además, 3 ratones TauP301L-Tg se recogieron a la edad de 3 meses sin ser sometidos a ningún tratamiento con el fin de determinar el nivel basal de patología en el momento del inicio del tratamiento.

30 35 Para recoger tejido, se anestesiaron con tribromoetanol al 2,5 % (0,5 ml por 25 g de peso corporal) y se perfundieron transcardialmente con PBS. Se recogieron los cerebros y se bisecaron. Los hemisferios derechos se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante la noche a 4 °C y después se transfirieron a solución salina tamponada con fosfato antes del procesamiento para inmunohistoquímica. Los hemisferios izquierdos se subdividieron en hielo y después se congelaron a -80 °C para el análisis bioquímico. Se tomaron clips de la cola de todos los ratones para confirmar los genotipos.

40 45 Los hemicerebros se incluyeron en una matriz de gelatina usando bloques MultiBrain® (NeuroScience Associates, Knoxville, TN) y se seccionaron coronalmente con un grosor de 25  $\mu\text{m}$ . Dentro de cada bloque, la posición del cerebro fue aleatoria con respecto a el genotipo y el tratamiento. Se tiñeron secciones de flotación libre de hemicerebros individuales de ratón o de bloques MultiBrain® como se describió anteriormente (Le Pichon *et al.*, 2013, *PLoS One*, 8(4): e62342), pero con lavados en PBS en lugar de solución salina tamponada con Tris e incubaciones de anticuerpos primarios a 4 °C en lugar de a temperatura ambiente. El anticuerpo primario fue anti-pTau212/214 de conejo (generado internamente; 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Para evitar una tinción de fondo elevada, en el caso de los anticuerpos primarios de ratón que eran específicos de subtipo, se usó el anticuerpo secundario específico del subtipo correspondiente (por ejemplo, IgG3 antiratón biotinilado, Bethyl A90-111B).

50 55 60 Los portaobjetos teñidos inmunohistoquímicamente se fotografiaron con el sistema de escaneado de diapositivas completas Leica SCN400 (Leica Microsystems; Buffalo Grove, IL) a 200 aumentos con una resolución de 0,5  $\mu\text{m}/\text{píxel}$ . Se trazaron manualmente las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) en 4 niveles de hipocampo emparejados por animal, y la cantidad de tinción en estas ROI se cuantificó de forma automatizada usando los dos criterios de valoración que se describen a continuación. Todos los análisis de imágenes se realizaron sin tener en cuenta el genotipo ni los grupos de tratamiento. Para el análisis del área de píxeles positivos para la cuantificación de tinciones de IHC, se analizaron imágenes digitales de secciones de cerebro marcadas con anticuerpos como se ha descrito anteriormente (Le Pichon *et al.*, 2013). El porcentaje de área teñida se calculó normalizando los píxeles positivos totales al área de píxeles total de la ROI. La intensidad integrada se calculó usando la ley de Beer-Lambert,  $\text{absorbancia} = -\log(\text{intensidad de luz transmitida} / \text{intensidad de luz incidente})$ , sólo para las áreas de píxeles positivos.

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

65 **Ejemplo 11: Variantes de 37D3-H9 kappa 1 humanizadas**

Se produjeron variantes de anticuerpos humanizados basados en hu37D3-H9.v1, que tiene una cadena ligera kappa 1, y se sometió a ensayo su estabilidad N<sup>28</sup>. En la Figura 18 se muestra una alineación de la región variable de cadena ligera de las tres variantes sometidas a ensayo 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.

Las muestras de anticuerpos se sometieron a estrés térmico, de la siguiente manera. Las muestras se intercambiaron el tampón en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 5,5 y se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml. Un ml de muestra se estresó a 40 °C durante 2 semanas y un segundo se almacenó a -70 °C como control. Después, ambas muestras se digirieron usando tripsina para crear péptidos que pudieran analizarse usando cromatografía de líquidos (CL) - espectrometría de masas (EM). Para cada péptido en el tiempo de retención de la muestra, se adquirió el tiempo de retención de la LC como la masa exacta de alta resolución y la información de fragmentación de iones peptídicos (información de la secuencia de aminoácidos) en la MS. Se tomaron chromatogramas de iones extraídos (XIC) para los péptidos de interés (iones de péptidos nativos y modificados) de los conjuntos de datos en una ventana de ±10 ppm y se integraron los picos para determinar el área. Los porcentajes relativos de modificación se calcularon para cada muestra tomando el (área del péptido modificado) dividido por (área del péptido modificado más el área del péptido nativo) multiplicado por 100. Después, estos porcentajes relativos se compararon entre las muestras de control (t = 0) y las estresadas (t = 2 semanas). Los porcentajes mostrados representan el valor de control (t = 0) restado del valor estresado (t = 2 semanas). Los resultados se muestran en la Tabla 21. Los resultados demuestran que la mutación F33L es eficaz para reducir la desamidación en una cadena ligera kappa 1 humanizada.

Tabla 21 - Estabilidad de las variantes hu37D3-H9.v1 en ensayos de estrés para determinar la desamidación.

Anticuerpo		Aumento de la desamidación de N <sup>28</sup> G <sup>29</sup> N <sup>30</sup> de cadena ligera
hu37D3.v39	hlgG4.S228P.YTE	N <sup>28</sup> : 2,7 % N <sup>30</sup> : No se detecta ningún aumento significativo
hu37D3.v40	hlgG4.S228P.YTE	N <sup>28</sup> : 12,1 % N <sup>30</sup> : 3,9 %
hu37D3.v41	hlgG4.S228P.YTE	N <sup>28</sup> : 6,0 % N <sup>30</sup> : Resto reemplazado con glutamina

La afinidad de las variantes de anticuerpos humanizados se midió a 25 °C usando un instrumento Biacore T200, el kit de captura de FAb humana GE Biacore y un chip CM5 Serie S. Los anticuerpos se diluyeron a 1 µg/ml en HBSP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %) y se capturaron a un flujo de 10 µl/min durante 180 segundos. Se recogieron datos cinéticos para el monómero de Tau humana inyectado a 1,2, 3,7, 11, 33 y 100 nM en HBSP usando la metodología de cinética de ciclo único y un caudal de 30 µl/min. Cada concentración de monómero de Tau se inyectó durante un período de 3 minutos y la disociación se controló durante diez minutos. Entre los ciclos, la superficie se regeneró con dos inyecciones secuenciales de un minuto de glicina 10 mM pH2,1. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el software BIAEvaluation. Cada anticuerpo se analizó dos veces en el experimento; los datos de la Tabla 22 se muestran como media ± intervalo.

Tabla 22: Afinidades de las variantes de hu37D3-H9.v1 por la Tau monomérica

	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>asociación</sub> (1/Ms)	K <sub>disociación</sub> (1/s)
hlgG1 hu37D3.v1	2,3 ± 0,3	6 ± 0,5 × 10 <sup>5</sup>	1 ± 0,1 × 10 <sup>-3</sup>
hlgG4 hu37D3.v1	2,3 ± 0,3	6 ± 0,2 × 10 <sup>5</sup>	1 ± 0,1 × 10 <sup>-3</sup>
hlgG4.YTE hu37D3.v39	1,9 ± 0,2	6 ± 0,6 × 10 <sup>5</sup>	1 ± 0,02 × 10 <sup>-3</sup>
hlgG4.YTE hu37D3.v40	4,4 ± 0,5	8 ± 0,9 × 10 <sup>5</sup>	3 ± 0,02 × 10 <sup>-3</sup>
hlgG4.YTE hu37D3.v41	5,4 ± 0,3	9 ± 1,2 × 10 <sup>5</sup>	5 ± 0,3 × 10 <sup>-3</sup>

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

Para evaluar la farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 *in vivo*, cinco macacos cangrejeros conscientes (*Macaca fascicularis*) por grupo recibieron una única inyección IV en embolada a una dosis de 50 mg/kg en la primera fase. Se usó hlgG4 anti-gD como control, también a una dosis de 50 mg/kg. En diversos puntos temporales hasta 35 días después de la dosis, se recogieron muestras de plasma y LCR para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-Tau. Después de la recogida final de muestras, se dejó que los animales se recuperaran durante 63-64 días antes de iniciar la segunda fase. En la

segunda fase, los 15 animales de la primera fase, más 3 animales adicionales, se dividieron en dos grupos; al primer grupo (n=9) se le administró el anticuerpo hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 y al segundo grupo (n=9) se le administró el anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, ambos a 50 mg/kg. Se recogieron los cerebros de 4 o 5 animales por grupo a los 2 y 10 días de la dosis.

5 Se midieron los anticuerpos IgG4 humanos en plasma, LCR y homogeneizado cerebral (descritos a continuación) de macaco cangrejero con un ELISA usando una capa de anticuerpos anti-IgG humana de oveja adsorbidos en mono, seguido de la adición de muestras de plasma partiendo de una dilución de 1:100, muestras de LCR partiendo de una dilución de 1:20 o muestras de homogeneizado de cerebro partiendo de una dilución de 1:10, y se termina añadiendo 10 un anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante de mono para su detección. El color se reveló con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y se neutralizó con ácido fosfórico 1 M. Las muestras se leyeron a 450/620 nm. El ensayo tiene un rango de curva patrón de 0,156-20 ng/ml y un límite de detección de 0,02 ug/ml para plasma, 0,003 ug/ml para LCR y 0,002 ug/ml para homogeneizado de cerebro. Los resultados por debajo de esta concentración se notificaron como menos que notificables (LTR).

15 10 Los resultados del análisis farmacocinético se muestran en la Figura 19A (plasma) y 19B (LCR), y en las Tablas 23 y 24. Se excluyeron del análisis los animales sospechosos de ser positivos para anticuerpos antiterapéuticos (ATA+). Estos datos muestran que la introducción de las mutaciones YTE en la región Fc de hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4 15 ralentizó las tasas de aclaramiento periférico y del LCR del anticuerpo aproximadamente dos veces.

20 Tabla 23: Estimaciones de la media ( $\pm$  DE) del aclaramiento plasmático y la  $C_{\text{máx}}$  después de una dosis única en embolada IV

Anticuerpo	Aclaramiento en plasma (ml/día/kg)	$C_{\text{máx}}$ (ug/ml)
hlgG4 anti-gD	1,67 $\pm$ 0,415	1950 $\pm$ 174
hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4	2,09 $\pm$ 0,229	1970 $\pm$ 144
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	1,12 $\pm$ 0,233	1850 $\pm$ 156

25 Tabla 24: Estimaciones de la media ( $\pm$  DE) del LCR y la  $C_{\text{máx}}$  después de una dosis única en embolada IV

Anticuerpo	$C_{\text{máx}}$ (ug/ml)
hlgG4 anti-gD	1,39 $\pm$ 0,751
hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4	0,910 $\pm$ 0,552
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	2,51 $\pm$ 1,93

25 30 La concentración en cerebro de los anticuerpos a los 2 y 10 días post-inyección se determinó de la siguiente manera. El tejido cerebral se pesó y después se homogeneizó en NP-40 al 1 % en solución salina tamponada con fosfato que contenía cOmplete™, Mini, comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasa exentos de EDTA. Después, las muestras de cerebro homogeneizadas se rotaron a 4 °C durante 1 hora antes de centrifugarlas a 14.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se aisló para la medición de anticuerpos de cerebro mediante ELISA, como se ha descrito anteriormente. Los resultados de ese experimento se muestran en las Figuras 21A-D. La concentración del anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en el cerebro y la relación de la concentración cerebro:plasma del anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 tendieron a ser superiores a las del anticuerpo hlgG4.S228P hu37D3.v28.A4.

35 40 También se determinó la respuesta farmacodinámica en plasma. La concentración de Tau total en plasma K<sub>2</sub>EDTA se determinó usando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) (Roche Professional Diagnostics (RPD)), Penzberg, Alemania). El inmunoensayo Elecsys® está validado para la cuantificación de Tau total en LCR humano, y debido a la similitud entre la Tau humana y la de macaco cangrejero, se consideró aceptable para la medición de Tau de macaco cangrejero en LCR y plasma. El ensayo captura y detecta los aminoácidos 159-224 de Tau humana y de macaco cangrejero, una región presente en todas las isoformas conocidas, independientemente del estado de fosforilación. El límite de detección inferior (LDL, por sus siglas en inglés) del ensayo es de 1,01 pg/ml. El ensayo es tolerante a 15,0 mg/ml de hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4.

45 50 Los resultados del análisis farmacodinámico se muestran en la Figura 20. Había 3 animales por grupo después de excluir a los animales sospechosos de ser ATA+ y otro animal que carecía de valores basales. Sorprendentemente, durante el primer día de la dosis, los niveles plasmáticos de Tau aumentan en mayor medida en los animales tratados con la variante YTE frente a los no tratados con la variante YTE. Además, ese resultado no se predice a partir de la respuesta farmacocinética (Figura 20), ya que la FC es similar entre las variantes en los primeros puntos temporales. Se mantiene una respuesta más sólida en los animales tratados con la variante YTE durante toda la duración del muestreo.

Ejemplo 13: Farmacocinética y farmacodinámica de hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 en cerebro de macaco

**cangrejero**

Para evaluar la farmacocinética de los anticuerpos en el cerebro, doce macacos cangrejeros conscientes (*Macaca fascicularis*) por grupo recibieron una única inyección IV en embolada de hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 a una

5 dosis de 50 mg/kg. Se usó hlgG4 anti-gD como control, también a una dosis de 50 mg/kg. En diversos puntos temporales hasta 42 días después de la dosis, se recogieron muestras de plasma para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-Tau. Además, en diversos puntos temporales hasta los 42 días, se sacrificaron 2 monos y se determinaron las concentraciones de anticuerpos en cerebro y LCR.

10 Las concentraciones de anticuerpos se determinaron sustancialmente como se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 22A-B muestra la concentración de anticuerpo en cerebro de macaco cangrejero en diversos puntos temporales después de la dosis, representada en escala logarítmica (A) y lineal (B). La Tabla 25 muestra los 15 parámetros de concentración en cerebro.

15 Tabla 25: Estimaciones de los parámetros FC de cerebro medios ( $\pm$  DE) después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx (μg/ml)	ABCtodos (día*μg/ml)
hlgG4 anti-gD	0,175 $\pm$ 0,02	4,26 $\pm$ 0,35
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,12 $\pm$ 0,03	3,88 $\pm$ 0,89

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

20 La concentración de anticuerpos en diversas regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, el cerebelo y la corteza frontal, también se determinó. La Figura 23A-C y las Tablas 26 a 28 muestran los resultados de ese análisis.

25 Tabla 26: Estimaciones de los parámetros FC de hipocampo medios después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx (μg/ml)	ABCtodos (día*μg/ml)
hlgG4 anti-gD	0,159	3,95
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,087	2,87

25 Tabla 27: Estimaciones de los parámetros FC de cerebelo medios después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx (μg/ml)	ABCtodos (día*μg/ml)
hlgG4 anti-gD	0,196	4,30
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,139	4,56

Tabla 28: Estimaciones de los parámetros PK de corteza frontal medios después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx (μg/ml)	ABCtodos (día*μg/ml)
hlgG4 anti-gD	0,17	4,65
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	0,138	4,22

30 Los resultados de ese experimento muestran la exposición de diversas regiones del cerebro al anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 después de una única inyección IV. Las exposiciones globales en el cerebro fueron comparables en los dos grupos, sin embargo, de manera similar a las observaciones en plasma, en los animales dosificados con el anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, las concentraciones de anticuerpos en el cerebro se duplicaron aproximadamente en el punto temporal terminal, en comparación con anti-gD. Véase la Figura 23. Estos 35 resultados sugieren el mantenimiento de concentraciones mínimas (terminales) más elevadas en el cerebro después de la dosificación del anticuerpo YTE.

También se determinó la concentración de los anticuerpos en el LCR y el plasma a lo largo del tiempo. Las Figuras 23D (LCR) y 23E (plasma) y las Tablas 29 y 30 muestran los resultados de ese análisis.

40 Tabla 29: Estimaciones de los parámetros FC de LCR medios después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx (μg/ml)	ABCtodos (día*μg/ml)
hlgG4 anti-gD	1,270	18,400
hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4	3,980	21,100

Tabla 30: Estimaciones de los parámetros FC de plasma medios después de una dosis única en embolada IV

Grupo	Cmáx ( $\mu$ g/ml)	Tmáx Día	ABCtodos (día* $\mu$ g/ml)	Terminal (Día 43) $\mu$ g/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

De nuevo, de manera similar a la farmacocinética de plasma y cerebro, en los animales dosificados con el anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4, la concentración de anticuerpos en el LCR y el plasma se duplicó aproximadamente en el punto temporal terminal, en comparación con anti-gD. Véase la Figura 23.

Usando las muestras de plasma recogidas de los macacos cangrejeros, se evaluó la farmacodinámica plasmática del anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 y del anticuerpo de control después de una única dosis IV de 50 mg/kg. La Tau plasmática se cuantificó usando el inmunoensayo Elecsys® analizado en el Ejemplo 12.

Los resultados del análisis farmacodinámico se muestran en la Figura 24A-B. La Figura 24A muestra la media de la concentración plasmática total de Tau, normalizada con respecto al valor basal. La Figura 24B muestra la concentración de Tau en plasma total en monos individuales en el estudio, normalizada con respecto al valor basal. De manera similar a los resultados observados en el Ejemplo 12, la administración del anticuerpo hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 produjo un aumento significativo de los niveles plasmáticos de Tau. Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría particular, estos datos sugieren que hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4 se une a Tau en el cerebro y, en consecuencia, Tau se aclara del cerebro a la periferia. Estos resultados son coherentes con el acoplamiento de la diana en el cerebro por hlgG4-S228P.YTE hu37D3.v28.A4.

Tabla de secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
2	Epítopo de Tau humana (2-24)	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRK
4	Epítopo Tau de macaco cangrejero (2-24)	AEPRQEFDVMDHAGTYGLGDRK
10	Región variable de cadena pesada de 37D3-H9 (VH)	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
11	Región variable de cadena ligera de 37D3-H9 (VL)	DDLITQTPLS LPVSLGDPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLVP WTFGGGTKLE IK
12	HVR-H1 de 37D3-H9	SYGMS
13	HVR-H2 de 37D3-H9	TINSGGTYTYYPDSVKKG
14	HVR-H3 de 37D3-H9	SYSGAMDY
15	HVR-L1 de 37D3-H9	RSSQSIVHSNGNTYFE
16	HVR-L2 de 37D3-H9	KVSNRFS
17	HVR-L3 de 37D3-H9	FQGSLVPWT
20	Región variable de cadena pesada de 37D3-H9b (VH)	EVQLVESGGD LAKPGGSLKL SCTASGLIFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCANSY SGAMDYWGQG TSVTVSS
21	Región variable de cadena ligera de 37D3-H9b (VL)	EDLLTQTPLS LPVSLGDPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYFEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSLVP WTFGGGTKLE IK
22	HVR-H1 de 37D3-H9b	SYGMS
23	HVR-H2 de 37D3-H9b	TINSGGTYTYYPDSVKKG
24	HVR-H3 de 37D3-H9b	SYSGAMDY
25	HVR-L1 de 37D3-H9b	RSSQSIVHSNGNTYFE
26	HVR-L2 de 37D3-H9b	KVSNRFS

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
27	HVR-L3 de 37D3-H9b	FQ GSLVPWT
30	Región variable de cadena pesada de 11E10-B8 (VH)	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGGSYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCAVSY DGAMDYWGQG TS TVSS
31	Región variable de cadena ligera de 11E10-B8 (VL)	DVLMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGL YYCFQGSHPV WTFGGGTKE IK
32	HVR-H1 de 11E10-B8	SYGMS
33	HVR-H2 de 11E10-B8	TISGGGSYTYYPDSVKG
34	HVR-H3 de 11E10-B8	SYDGAMDY
35	HVR-L1 de 11E10-B8	RSSQSIVHSNGNTYLE
36	HVR-L2 de 11E10-B8	KVSNRFS
37	HVR-L3 de 11E10-B8	FQGSHVPWT
40	Región variable de cadena pesada de 54C1-H11 y 61E7-C4 (VH)	EVQLVESGGD LVKPGGSLKV SCVASGFTFR SYGMSWVRQT PDKRLDWVAT ISSGGNYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCASSY SGAMDYWGQG TS TVSS
41	Región variable de cadena ligera de 54C1-H11 y 61E7-C4 (VL)	DTVMTQSPPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYTVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV WTFGGGTKE IK
42	HVR-H1 de 54C1-H11 y 61E7-C4	SYGMS
43	HVR-H2 de 54C1-H11 y 61E7-C4	TISSGGNYTYYPDSVKG
44	HVR-H3 de 54C1-H11 y 61E7-C4	SYSGAMDY
45	HVR-L1 de 54C1-H11 y 61E7-C4	RSSQSIVHSNGNTYLE
46	HVR-L2 de 54C1-H11 y 61E7-C4	TVSNRFS
47	HVR-L3 de 54C1-H11 y 61E7-C4	FQGSHVPWT
50	Región variable de cadena pesada de 3A4-H4 (VH)	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYFCATSY DGAMDYWGQG TS TVSS
51	Región variable de cadena ligera de 3A4-H4 (VL)	DVLMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGNNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGTLVP WTFGGGTKE IK
52	HVR-H1 de 3A4-H4	SYGMS
53	HVR-H2 de 3A4-H4	TISSGGTYTYYPDSVKG
54	HVR-H3 de 3A4-H4	SYDGAMDY
55	HVR-L1 de 3A4-H4	RSSQNIVHSNGNTYLE
56	HVR-L2 de 3A4-H4	KVSNRFS
57	HVR-L3 de 3A4-H4	FQGTLVPWT
60	Región variable de cadena pesada de 19H6-F7 (VH)	EVQLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT ISSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLKSED TAMYYCAPSY DGAMDYWGQG TS TVSS
61	Región variable de cadena ligera de 19H6-F7 (VL)	DVLMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSVP WTFGGGTKE IK

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
62	HVR-H1 de 19H6-F7	SYGMS
63	HVR-H2 de 19H6-F7	TISSGGTYTYPDSVKG
64	HVR-H3 de 19H6-F7	SYDGAMDY
65	HVR-L1 de 19H6-F7	RSSQSIVHSNGNTYLE
66	HVR-L2 de 19H6-F7	KVSNRFS
67	HVR-L3 de 19H6-F7	FQGSLVPWT
70	Región variable de cadena pesada de 94B2-C1 (VH)	EVQLQQSGPE LVKPGASMKI SCKASGYSLT GYTMNWKQS HGKMLIEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGKATL TVDKSNTAY MELLSLTfed SAVYYCARQG AYWQGQTLVT VSA
71	Región variable de cadena ligera de 94B2-C1 (VL)	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSL DSDGKTYLNW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP WTFGGGTKE IK
72	HVR-H1 de 94B2-C1	GYTMN
73	HVR-H2 de 94B2-C1	LISPYNGVTSYNQKFKG
74	HVR-H3 de 94B2-C1	QGAY
75	HVR-L1 de 94B2-C1	KSSQSLLSDGKTYLN
76	HVR-L2 de 94B2-C1	LVSKLDS
77	HVR-L3 de 94B2-C1	WQGTHFPWT
80	Región variable de cadena pesada de 125B11-H3 (VH)	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASRIFIS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLMNNLRA EDTGIYYCTG GTTYWGQGTT LTVSS
81	Región variable de cadena ligera de 125B11-H3 (VL)	DIVMTQSQKF LSTSVGDRVN ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GQSPGLLIYS ASIRYTGVPD RFTGNGSGTD FTLTISDMQS EDLADYFCQQ FRTYPYTFGG GTKLEIK
82	HVR-H1 de 125B11-H3	NYWMN
83	HVR-H2 de 125B11-H3	QIRLKSDNYA THYAESVKG
84	HVR-H3 de 125B11-H3	GTYY
85	HVR-L1 de 125B11-H3	KASQNVGTAVA
86	HVR-L2 de 125B11-H3	SASIRYT
87	HVR-L3 de 125B11-H3	QQFRTYPYT
90	Región variable de cadena pesada de 113F5-F7 (VH)	EVKLEESGGG LVQPGGSMRL SCVASEFTFS NYWMNWIRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDASNES VYLMNNLRA EDTGIYYCTG GTSYWGQGTT LTVSS
91	Región variable de cadena ligera de 113F5-F7 (VL)	DIVMTQSQKI MSTSVDGRVS ITCKASQNVG TAVAWYQQRP GHSFPLLIYS ASRRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTIINVQS EDLADYFCQQ FSTYPYTFGG GTKLEIK
92	HVR-H1 de 113F5-F7	NYWMN
93	HVR-H2 de 113F5-F7	QIRLKSDNYATHYAESVKG
94	HVR-H3 de 113F5-F7	GTSY
95	HVR-L1 de 113F5-F7	KASQNVGTAVA
96	HVR-L2 de 113F5-F7	SASRRFS
97	HVR-L3 de 113F5-F7	QQFSTYPYT
100	Región variable de cadena pesada de 26C1-B11 (VH)	EVHLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMYWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDEY FPKFQGKATM TADTSSKTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGQGTSVTVS S

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
101	Región variable de cadena ligera de 26C1-B11 (VL)	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP WTFGGGTKE IK
102	HVR-H1 de 26C1-B11	DYYMY
103	HVR-H2 de 26C1-B11	WIDPENGDTE YFPKFQG
104	HVR-H3 de 26C1-B11	WRARATNSAL DY
105	HVR-L1 de 26C1-B11	KSSQSLLSDS GKTYLN
106	HVR-L2 de 26C1-B11	LVSK LDS
107	HVR-L3 de 26C1-B11	WQGTHFPWT
110	Región variable de cadena pesada de 26C1-C8 (VH)	EVHLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DYYMYWVKQR
		PEQGLEWIGW IDPENGDTEY FPKFQGKATM TADTSSKTAY LQLSSLTSED TAVYYCNAWR ARATNSALDY WGGTTSVTVS S
111	Región variable de cadena ligera de 26C1-C8 (VL)	DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLRRPGQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP WTFGGGTKE IK
112	HVR-H1 de 26C1-C8	DYYMY
113	HVR-H2 de 26C1-C8	WIDPENGDTE YFPKFQG
114	HVR-H3 de 26C1-C8	WRARATNSAL DY
115	HVR-L1 de 26C1-C8	KSSQSLLSDS GKTYLN
116	HVR-L2 de 26C1-C8	LVSK LDS
117	HVR-L3 de 26C1-C8	WQGTHFPWT
120	Región variable de cadena pesada de 30G1-B2 (VH)	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYEMYWVKQT PVHGLEWIGA IDPETGDTAY NQKFKGKATL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYCIRQY GNWFPYWGQG TLVTVSA
121	Región variable de cadena ligera de 30G1-B2 (VL)	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HANGNTYLHW FLQKPGLSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGG GSGTDFTLKI TRLEAEDLGV YFCSQSTHVP FTFGSGTKLE IK
122	HVR-H1 de 30G1-B2	DYEMY
123	HVR-H2 de 30G1-B2	AIDPETGDTAYNQKFKG
124	HVR-H3 de 30G1-B2	QYGNWFPY
125	HVR-L1 de 30G1-B2	RSSQLVHANGNTYLH
126	HVR-L2 de 30G1-B2	KVSNRFS
127	HVR-L3 de 30G1-B2	SQSTHVPFT
130	Región variable de cadena pesada de 66F5-A1 (VH)	QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFTI DYEMNWKQT PVHGLEWIGA IDPENGGTAY NQKFKGKAIV TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCSGPH FDYWGQGTTL TVSS
131	Región variable de cadena ligera de 66F5-A1 (VL)	DIVMTQSPSS LAMSVGQKVT MSCKSSQSLL NSSTQKNYLA WYQQKPGQSP KLLVYFASTR ESGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA DYFCQQHYST PYTFGGTKE IK
132	HVR-H1 de 66F5-A1	DYEMN
133	HVR-H2 de 66F5-A1	AIDPENGGTA YNQKFKG
134	HVR-H3 de 66F5-A1	PHFDY
135	HVR-L1 de 66F5-A1	KSSQSLLNSS TQKNYLA
136	HVR-L2 de 66F5-A1	FASTRES

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
137	HVR-L3 de 66F5-A1	QQHYSTPYT
140	Región variable de cadena pesada de 123E9-A1 (VH)	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYMKWVKQS HGKSLIEWIGD IDPNNGGTSY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MQLNSLTSED SAVYYCARS A GFGDSFSFWG LGTLTVSA
141	Región variable de cadena ligera de 123E9-A1 (VL)	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGF YYCFQGSHVP PTFGGGTKE IK
142	HVR-H1 de 123E9-A1	DYYMK
143	HVR-H2 de 123E9-A1	DIDPNNGGTSYNQKFKG
144	HVR-H3 de 123E9-A1	SAGFGDSFSF
145	HVR-L1 de 123E9-A1	RSSQSIVHSNGNTYLE
146	HVR-L2 de 123E9-A1	KVSNRFS
147	HVR-L3 de 123E9-A1	FQGSHVPPT
150	Región variable de cadena pesada de 15C6-A7 (VH)	EVQLQQSGPE LVKPGASVMM TCKASGYTFT DYYMKWVKQS NGKSLIEWIGD LDPTGGANY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MHLNSLTSED SAVYYCARS R GYGD S FAYWG QGTLTVSA
151	Región variable de cadena ligera de 15C6-A7 (VL)	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDKFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQGSHVP PTFGGGTKE IK
152	HVR-H1 de 15C6-A7	DYYMK
153	HVR-H2 de 15C6-A7	DLDPYTGGAN YNQKFKG
154	HVR-H3 de 15C6-A7	SRGYGDSFAY
155	HVR-L1 de 15C6-A7	RSSQNIVHSN GNTYLE
156	HVR-L2 de 15C6-A7	KVSNRFS
157	HVR-L3 de 15C6-A7	FQGSHVPPT
160	Región variable de cadena pesada de 19F8-B1 (VH)	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYMKWVKQS HGKSLIEWIGD LNPKNGGTL Y NQKFKGQATL TVDKSSSTAY M QFNLSLTSED SAVYYCARS A GYGD S FAYWG QGTLTVSA
161	Región variable de cadena ligera de 19F8-B1 (VL)	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YFCFQGSHVP PTFGGGTKE IK
162	HVR-H1 de 19F8-B1	DYYMK
163	HVR-H2 de 19F8-B1	DLNPNNGGTL YNQKFKG
164	HVR-H3 de 19F8-B1	SAGYGDSFAY
165	HVR-L1 de 19F8-B1	RSSQNIVHSN GNTYLE
166	HVR-L2 de 19F8-B1	KVSNRFS
167	HVR-L3 de 19F8-B1	FQGSHVPPT
170	Región variable de cadena pesada de 24A11-D5 (VH)	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT DYYMKWVKQS HGKSLIEWIGD LNPKNGGIIY NQKFKGQATL TVDKSSSTAY M QFNLSLTSED SAVFYCARS G GYGD S FAYWG QGTLTVSA
171	Región variable de cadena ligera de 24A11-D5 (VL)	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YFCFQGSHVP PTFGGGTKE IK
172	HVR-H1 de 24A11-D5	DYYMK
173	HVR-H2 de 24A11-D5	DLNPKNGGII YNQKFKG
174	HVR-H3 de 24A11-D5	SGGYGDSFAY

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
175	HVR-L1 de 24A11-D5	RSSQNIVHSN GNTYLE
176	HVR-L2 de 24A11-D5	KVSNRFS
177	HVR-L3 de 24A11-D5	FQGSHVPPT
180	Región variable de cadena pesada de 126F11-G11 (VH)	EVQLQQSGAE LVRPGASVKL SCTASGFNIK DDYMHWVKQR PEQGLEWIGW IDPENGDTYE ASKFQGKATI TTDTSSNTAY LQLSLTSED TAVYYCLDFA YGYWGQGTTL TVSS
181	Región variable de cadena ligera de 126F11-G11 (VL)	DVLMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNITLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP FAFGGGKLE IK
182	HVR-H1 de 126F11-G11	DDYMH
183	HVR-H2 de 126F11-G11	WIDPENGDT E YASKFQG
184	HVR-H3 de 126F11-G11	FAYGY
185	HVR-L1 de 126F11-G11	RSSQSIVHSN GNTYLE
186	HVR-L2 de 126F11-G11	KVSNRFS
187	HVR-L3 de 126F11-G11	FQGSHVPPA
190	Región variable de cadena pesada de 89F4-A1 (VH)	EVQLVESGGG LVQPKGS LKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR IRSKSNNYAA YFADSVKDRF TISRDDSQT MLYLQMN LKS EDTAMYYCVS GGNYVPFAYW GQGTIVTVSA
191	Región variable de cadena ligera de 89F4-A1 (VL)	NIMMTQSPSS LAVSAGEKVT MSCKSSQSVF YSSEQRNYLA WYQQKPGQSPK LLLISWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQGEDLA VYYCHQYLSS FTFGSGTKLE IK
192	HVR-H1 de 89F4-A1	TYAMN
193	HVR-H2 de 89F4-A1	RIRSKSNNYAA YFADSVKD
194	HVR-H3 de 89F4-A1	GGNYVPFAY
195	HVR-L1 de 89F4-A1	KSSQSVFYSS EQRNYLA
196	HVR-L2 de 89F4-A1	WASTRES
197	HVR-L3 de 89F4-A1	HQYLSSFT
200	Región variable de cadena pesada de 93A8-D2 (VH)	EVQLQQSGPV LVKPGASV KM SCKASGYTFT DYYVNWVKQS HGKGLEWIGL INPNNNGRTSY NQNFDNDKATL TVDKSSSTAF MDLNSLTSED SAVYYCTREG GTGYWGQGTT LSVSS
201	Región variable de cadena ligera de 93A8-D2 (VL)	DVVTMQTPLT LSVTIGQSPAS ISCKSSQSL DSDGKTYLNW LLQRPQGSPR RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVAEADLGV YYCWQGTHFP RTFGGGTKLE IK
202	HVR-H1 de 93A8-D2	DYYVN
203	HVR-H2 de 93A8-D2	LINPNNGRTSYNQNFND
204	HVR-H3 de 93A8-D2	EGGTGY
205	HVR-L1 de 93A8-D2	KSSQSLLSDDGKTYLN
206	HVR-L2 de 93A8-D2	LVSKLDS
207	HVR-L3 de 93A8-D2	WQGTHFPRT
210	Región variable de cadena pesada de 14F5-D9 (VH)	EVKLVESGGG LVQPGGSLRL SCATSGFTFS DFYMEWVRQS PGKRLWIAA SKNKANDYTT EYNASVKDRF FVSRDTSQSI LYLQMNALRA EDTAIYCAR DALGTVFAYW GQGTIVTVSA
211	Región variable de cadena ligera de 14F5-D9 (VL)	DVVTMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNITLEW YLQKPGQSPK LLIYKVFNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCQSQSTLVP LTFGAGTKLE IK
212	HVR-H1 de 14F5-D9	DFYME

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
213	HVR-H2 de 14F5-D9	ASKNKANDYT TEYNASVKD
214	HVR-H3 de 14F5-D9	DALGTVFAY
215	HVR-L1 de 14F5-D9	RSSQSLVHSN GNTYLH
216	HVR-L2 de 14F5-D9	KVFNRFS
217	HVR-L3 de 14F5-D9	SQSTLVPLT
220	Región variable de cadena pesada de 73H6-B8 (VH)	QVQLKESGPG LVAPSQSLSI TCTISGFSLT SYGVHWVRQP PGKGLEWLVV IWSDGTTYN SALKSRLSIS KDNKSQVFL KMNSLQTDYT AMYYCARQGG FITTAYYAMD YWGQGTSVTV SS
221	Región variable de cadena ligera de 73H6-B8 (VL)	DIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MSCKSSQSLL NSRTRKNYLA WYQQKPCQSP KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA VYYCKQSYNL YTFFGGTKLE IK
222	HVR-H1 de 73H6-B8	SYGVH
223	HVR-H2 de 73H6-B8	VIWSDGSTTY NSALKS
224	HVR-H3 de 73H6-B8	QGGFITTAYY AMDY
225	HVR-L1 de 73H6-B8	KSSQSLLNSR TRKNYLA
226	HVR-L2 de 73H6-B8	WASTRES
227	HVR-L3 de 73H6-B8	KQSYNLYT
230	Región variable de cadena pesada de 22G7-C9 (VH)	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DCSIHWVKQA PGEGLKWMGW INTETGEPSY ADDFKGRFAF SLETSASTAF LQINNLKED TASYFCGTAY YRYDGALDYW GQGTSVTVSS
231	Región variable de cadena ligera de 22G7-C9 (VL)	DIVITQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASQSVS TSSYSYMHWF QQKPGQPPKL LIKYASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWELPW TFGGGTTKLE IK
232	HVR-H1 de 22G7-C9	DCSIH
233	HVR-H2 de 22G7-C9	WINTETGEPS YADDFKG
234	HVR-H3 de 22G7-C9	AYYRYDGALD Y
235	HVR-L1 de 22G7-C9	RASQSVSTSS YSYMH
236	HVR-L2 de 22G7-C9	YASNLES
237	HVR-L3 de 22G7-C9	QHSWELPW
240	Región variable de cadena pesada de 7A11-C12 (VH)	QIQLVQSGPD LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGKWMGW INTNTGEPTY AEEFKGRFAF SLETSASTAY LQIDNLKNED TATYFCARGT VSFPYWQGT LVTVSA
241	Región variable de cadena ligera de 7A11-C12 (VL)	DVVMQTPPLS LPVSLGDHAS ISCRSSQNLV HSDGNTYLNW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCQSSTHVI FTFGSGTKLE IK
242	HVR-H1 de 7A11-C12	NYGMN
243	HVR-H2 de 7A11-C12	WINTNTGEPT YAEEFKG
244	HVR-H3 de 7A11-C12	GTVSFPY
245	HVR-L1 de 7A11-C12	RSSQNLVHSD GNTYLH
246	HVR-L2 de 7A11-C12	KVSNRFS
247	HVR-L3 de 7A11-C12	SQSTHVIFT
250	Región variable de cadena pesada de 12A10-E8 (VH)	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA PGKGKWMGW INMYTGEPTY GDDFKGRFVF SLETSVSTVY LQINNLKED TATFFCARGG RPDYWGQGTS VTVSS
251	Región variable de cadena ligera de 12A10-E8 (VL)	DVLMTQTPPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSVI HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVFNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI NRVEAEDLGV YYCLQGSHVP YTFFGGTKLE IK

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
252	HVR-H1 de 12A10-E8	NYGMN
253	HVR-H2 de 12A10-E8	WINMYTGEPT YGDDFKG
254	HVR-H3 de 12A10-E8	GGRPDY
255	HVR-L1 de 12A10-E8	RSSQSIVHSN GNTYLE
256	HVR-L2 de 12A10-E8	KVFNRFS
257	HVR-L3 de 12A10-E8	LQGSHVPYT
260	Región variable de cadena pesada de 55E7-F11 (VH)	EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDS KSS VYLQMNLLRA EDTGIYYCAG YFYGGYFDWV GTCTTVSS
261	Región variable de cadena ligera de 55E7-F11 (VL)	ELVLTQSPTT MAASPGKKIT ITC SASSSIS SNYLHWYQQK PGFSPKLLIY RTSNLLASGVF ARFSGSGSGT SYSLTIGTME AEDVATYYCQ QGSSLPFTFG SGTKLEIK
262	HVR-H1 de 55E7-F11	NYWMN
263	HVR-H2 de 55E7-F11	QIRLKSDNYA THYAESVKG
264	HVR-H3 de 55E7-F11	YFYGGYFDV
265	HVR-L1 de 55E7-F11	SASSSISSNY LH
266	HVR-L2 de 55E7-F11	RTSNLAS
267	HVR-L3 de 55E7-F11	QQGSSLPFT
270	Región variable de cadena pesada de 52F6-F11 (VH)	QVQIQQSGTE LAKPGASVKL SCKASGYTFT HYWMHWIKQR PGQGLEWIGY IYPTNDYTKY NQNFRDKATL TADESSNSAY MQLNSLTYED SAVYYCARAG NRVFDFWGQG TTLTVSS
271	Región variable de cadena ligera de 52F6-F11 (VL)	QAVVTQESAL TTSPGETVTL TC RSSTGAVT TSNFANWVQE KPDHIFTGLI GGTNNRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF GGGTKLTVL
272	HVR-H1 de 52F6-F11	HYWMH
273	HVR-H2 de 52F6-F11	YIYPTNDYTK YNQNFRD
274	HVR-H3 de 52F6-F11	AGNRVFDF
275	HVR-L1 de 52F6-F11	RSSTGAVTTS NFAN
276	HVR-L2 de 52F6-F11	GTNNRAP
277	HVR-L3 de 52F6-F11	ALWYSNLWV
280	Región variable de cadena pesada de Hu37D3-H9.v1 (VH)	EVQIIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDN SKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
281	Región variable de cadena ligera de Hu37D3-H9.v1(VL)	EDQLTQSPTT LSASVGDRVT ITC RSSQSIV HSNGNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
282	HVR-H1 de Hu37D3-H9.v1	SYGMS
283	HVR-H2 de Hu37D3-H9.v1	TINSGGTYTYYPDSVKG
284	HVR-H3 de Hu37D3-H9.v1	SYSGAMDY
285	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v1	RSSQSIVHSNGNTYFE
286	HVR-L2 de Hu37D3-H9.v1	KVSNRFS
287	HVR-L3 de Hu37D3-H9.v1	FQGSLVPWT

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
288	Cadena pesada de IgG1 Hu37D3 H9.v1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSPVFLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYY PEPVTIVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSLGTQTYIC NVNHIKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK FREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQCG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
289	Cadena ligera de IgG1 Hu37D3 H9.v1	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSRSSQSIV HSNGNNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLTSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPFV TKSFRNRGEC
290	Región variable de cadena pesada de Hu37D3-H9.v5 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
291	Región variable de cadena ligera de Hu37D3-H9.v5(VL)	EDVLTQTPS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNGNNTYFEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
292	HVR-H1 de Hu37D3-H9.v5	SYGMS
293	HVR-H2 de Hu37D3-H9.v5	TINSGGTYTYYPDVKKG
294	HVR-H3 de Hu37D3-H9.v5	SYSGAMDY
295	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5	RSSQSIVHSNGNTYFE
296	HVR-L2 de Hu37D3-H9.v5	KVSNRFS
297	HVR-L3 de Hu37D3-H9.v5	FQGSLVPWT
300	Región variable de cadena pesada de Hu94B2.v105 (VH)	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
301	Región variable de cadena ligera de Hu94B2.v 105 (VL)	DIVMTQTPS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTKVE IK
302	HVR-H1 de Hu94B2.v105	GYTMN
303	HVR-H2 de Hu94B2.v105	LISPYNGVTSYNQKFKG
304	HVR-H3 de Hu94B2.v105	QGAY
305	HVR-L1 de Hu94B2.v105	KSSQSLLSDGKTYLN
306	HVR-L2 de Hu94B2.v105	LVSKLDS
307	HVR-L3 de Hu94B2.v105	WQGTHFPWT
310	Región variable de cadena pesada de hu125B11.v17 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IIRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDSNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
311	Región variable de cadena ligera de hu125B11.v17 (VL)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVPs RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
312	HVR-H1 de hu125B11.v17	NYWMN
313	HVR-H2 de hu125B11.v17	QIRLKSDNYATHYAESVKKG
314	HVR-H3 de hu125B11.v17	GTYY
315	HVR-L1 de hu125B11.v17	KASQNVGTAVA

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
316	HVR-L2 de hu125B11.v17	SASIRYT
317	HVR-L3 de hu125B11.v17	QQFRTYPYT
320	Región variable de cadena pesada de hu125B11.v26 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNLSRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
321	Región variable de cadena ligera de hu125B11.v26 (VL)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP3 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
322	HVR-H1 de hu125B11.v26	NYWMN
323	HVR-H2 de hu125B11.v26	QIRLKSDNYATHYAESVKG
324	HVR-H3 de hu125B11.v26	GTYY
325	HVR-L1 de hu125B11.v26	KASQNVGTAVA
326	HVR-L2 de hu125B11.v26	SASIRYT
327	HVR-L3 de hu125B11.v26	QQFRTYPYT
330	Región variable de cadena pesada de hu125B11.v28 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDNSKNT LYLQMNLSRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
331	Región variable de cadena ligera de hu125B11.v28 (VL)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVP3 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFGQ GTKVEIK
332	HVR-H1 de hu125B11.v28	NYWMN
333	HVR-H2 de hu125B11.v28	QIRLKSDNYATHYAESVKG
334	HVR-H3 de hu125B11.v28	GTYY
335	HVR-L1 de hu125B11.v28	KASQNVGTAVA
336	HVR-L2 de hu125B11.v28	SASIRYT
337	HVR-L3 de hu125B11.v28	QQFRTYPYT
340	Región variable de cadena pesada de Hu37D3-H9.v28.A4 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSS
341	Región variable de cadena ligera de Hu37D3-H9.v28.A4(VL)	DDVLTQPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSNGNNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
342	HVR-H1 de Hu37D3-H9.v28.A4	SYGMS
343	HVR-H2 de Hu37D3-H9.v28.A4	TINSGGTYTYYPDSVKG
344	HVR-H3 de Hu37D3-H9.v28.A4	SYSGAMDY
345	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v28.A4	RSSQSIVHSNGNTYLE
346	HVR-L2 de Hu37D3-H9.v28.A4	KVSNRFS
347	HVR-L3 de Hu37D3-H9.v28.A4	FQGSLVPWT

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
348	Cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v28.A4	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDN SKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSPVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYL PEPVTWWSNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS SSI GTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NYTQKSLSL SLGK
602	Cadena pesada de des-K de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v28.A4	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDN SKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLVTVSSAST KGPSPVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYL PEPVTWWSNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSS SSI GTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NYTQKSLSL SLG
349	Cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3-H9.v28.A4	DDVLTQTPLS LPVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSN GNTYLEW YLQKPGQSPQ LLIYKVSNRF SGVPDRPSGS GSGTDFTLKI SRVIAEDVGV YC FQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIPPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTL SKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSFPV TKS FNR GEC
442	hu125B11-H3.LC1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTFQG GTKVEIK
443	hu125B11-H3.LC2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FRTYPYTFQG GTKVEIK
444	hu125B11-H3.LC3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASIRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFQG GTKVEIK
445	hu125B11-H3.LC4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASIRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FRTYPYTFQG GTKVEIK
446	hu125B11-H3.HC1	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDS KNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
447	hu125B11-H3.HC2	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
448	hu125B11-H3.HC3	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
449	hu125B11-H3.HC4	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDN SKNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
450	hu125B11-H3.HC5	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYWMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDS KNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
451	hu125B11-H3.HC6	EVQIVESGGG LVQPGGSLRL SCAASRFIFS NYFMNWVRQA PGKGLEWVAQ IRLKSDNYAT HYAESVKGRF TISRDDS KNT VYLMQNSLRA EDTAVYYCTG GTTYWGQGTL VTVSS
452	Hu94B2.HC1	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYT MNWVRQA PGQGLEWIGL ISP YNGVTSY NQKFKGRATL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS
453	Hu94B2.HC2	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYT MNWVRQA PGQGLEWIGL ISP YNGVTSY NQKFKGRVTL TVDKSTSTAY LELSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGT LVT VSS

# ES 2 991 587 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
454	Hu94B2.HC3	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATI TVDKSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
455	Hu94B2.HC4	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TRDKSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
456	Hu94B2.HC5	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRATL TVDTSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
457	Hu94B2.HC6	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
458	Hu94B2.HC7	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TRDKSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
459	Hu94B2.HC8	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSLT GYTMNWVRQA PGQGLEWIGL ISPYNGVTSY NQKFKGRVTI TVDTSTSTAY LELOSSLRSED TAVYYCARQG AYWGQGTLVT VSS
460	Hu94B2.LC9	DVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
461	Hu94B2.LC10	DVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
462	Hu94B2.LC11	DVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
463	Hu94B2.LC12	DVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
464	Hu94B2.LC13	DIVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
465	Hu94B2.LC14	DIVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
466	Hu94B2.LC15	DIVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
467	Hu94B2.LC16	DIVVTMQTPLS LPVTPGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW YLQKPGQSPQ LLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP WTFGQGTTKVE IK
468	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.1	RSSQSIVHSNANTYFE
469	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.2	RSSQSIVHSSGNTYFE
470	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.3	RSSQSIVHSDGNTYFE
471	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.4	RSSQSIVHSQGNTYFE
472	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.5	RSSQSIVHSEGNTYFE
473	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.6	RSSQSIVHSAGNTYFE
474	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.7	RSSQSIVHSNGDTYFE
475	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.8	RSSQSIVHSNGQTYFE
476	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.9	RSSQSIVHSNGETYFE
477	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.10	RSSQSIVHSNGATYFE
478	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v5.11	RSSQSIVHSNGSTYFE
479	HVR-L1 de Hu37D3.v28	RSSQSIVHSNGNTYFE

# ES 2 991 587 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
480	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A2	RSSQSIVHSNGNTYFE
481	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A4	RSSQSIVHSNGNTYLE
482	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A6	RSSQSIVHSNGNTYLE
483	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A8	RSSQSIVHSNGNTYFE
484	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A10	RSSQSIVHSNGNTYFE
485	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A12	RSSQSIVHSNGNTYLE
486	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A14	RSSQSIVHSNGNTYLE
487	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A16	RSSQSIVHSNGNTYFE
488	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A18	RSSQSIVHSNGNTYFE
489	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A20	RSSQSIVHSNGNTYLE
490	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A22	RSSQSIVHSNGNTYLE
491	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A24	RSSQSIVHSNGNTYFE
492	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A26	RSSQSIVHSNGNTYFE
493	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A28	RSSQSIVHSNGNTYLE
494	HVR-L1 de Hu37D3.v28.A30	RSSQSIVHSNGNTYLE
495	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B1	RSSQSIVHSIGNTFFE
496	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B2	RSSQSIVHSMGNTRFFE
497	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B3	RSSQSIVHSQGNTWFE
498	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B4	RSSQSIVHSQGNTHFE
499	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B6	RSSQSIVHSDGNTRFE
500	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B7	RSSQSIVHSDGNTKFE
501	HVR-L1 de Hu37D3.v28.B8	RSSQSIVHSEGTRFE
502	HVR-L1 de Hu37D3.v28.C1	RSSQSIVHSNNNTYFE
503	HVR-L1 de Hu37D3.v28.C2	RSSQSIVHSNDNTYFE
504	HVR-L1 de Hu37D3.v28.D1	RSSQSIVHANGNTYFE
505	HVR-L1 de Hu37D3.v28.E1	RSSQSIVNSNGNTYFE
506	HVR-L1 de Hu37D3.v28.E2	RSSQSIVQSNGNTYFE
507	HVR-L1 de Hu37D3.v28.E3	RSSQSIVDSDGNTYFE
508	HVR-L1 de Hu37D3.v28.F1	RSSQSIVHSNTNTYFE
509	HVR-L1 de Hu37D3.v28.F2	RSSQSIVHTNGNTYFE
510	HVR-L1 de Hu37D3.v28.F3	RSSQSIVHTNANTYFE
511	HVR-L1 de Hu37D3.v28.51	RSSQSIVHSHGNTYFE
512	HVR-L1 de Hu37D3.v28.52	RSSQSIVHSKGNTYFE
513	HVR-L1 de Hu37D3.v28.53	RSSQSIVHSRGNTYFE
514	HVR-L1 de Hu37D3.v28.54	RSSQSIVHSLGNTYFE
515	HVR-L1 de Hu37D3.v28.55	RSSQSIVHSNQNTYFE
516	HVR-L1 de Hu37D3.v28.56	RSSQSIVHSNYNTYFE

# ES 2 991 587 T3

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
517	HVR-L1 de Hu37D3.v28.57	RSSQSIVHSNFNTYFE
518	HVR-L1 de Hu37D3.v29.1	RSSQSIVHSNGDTYFE
519	HVR-L1 de Hu37D3.v29.2	RSSQSIVHSNGQTYFE
520	HVR-L1 de Hu37D3.v29.3	RSSQSIVHSNGETYFE
521	HVR-L1 de Hu37D3.v29.4	RSSQSIVHSNGATYFE
522	HVR-L1 de Hu37D3.v29.5	RSSQSIVHSNGHTYFE
523	HVR-L1 de Hu37D3.v29.6	RSSQSIVHSNGKTYFE
524	HVR-L1 de Hu37D3.v29.7	RSSQSIVHSNGHTYFE
525	HVR-L1 de Hu37D3.v29.8	RSSQSIVHSNADTYFE
526	HVR-L1 de Hu37D3.v29.9	RSSQSIVHSNAQTYFE
527	HVR-L1 de Hu37D3.v29.10	RSSQSIVHSNAETYFE
528	HVR-L1 de Hu37D3.v29.11	RSSQSIVHSNAATYFE
529	HVR-L1 de Hu37D3.v29.12	RSSQSIVHSNAHTYFE
530	HVR-L1 de Hu37D3.v29.13	RSSQSIVHSNAKTYFE
531	HVR-L1 de Hu37D3.v29.14	RSSQSIVHSNALTYFE
532	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.1	RSSQSIVHSGGNTYFE
533	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.2	RSSQSIVHSTGNTYFE
534	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.3	RSSQSIVHSGNTYFE
535	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.4	RSSQSIVHSLGNTYFE
536	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.5	RSSQSIVHSIGNTYFE
537	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.6	RSSQSIVHSPGNTYFE
538	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.7	RSSQSIVHSFGNTYFE
539	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.8	RSSQSIVHSYGNNTYFE
540	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.9	RSSQSIVHSHGNTYFE
541	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.10	RSSQSIVHSKGNTYFE
542	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v30.11	RSSQSIVHSRGNTYFE
543	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.1	RSSQSIVHSNAGTYFE
544	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.2	RSSQSIVHSNAVTYFE
545	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.3	RSSQSIVHSNAITYFE
546	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.4	RSSQSIVHSNAPTYFE
547	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.5	RSSQSIVHSNAFTYFE
548	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.6	RSSQSIVHSNAYTYFE
549	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.7	RSSQSIVHSNARTYFE
550	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.8	RSSQSIVHSNANVYFE
551	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.9	RSSQSIVHSNANIYFE
552	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.10	RSSQSIVHSNANPYFE

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
553	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.11	RSSQSIVHSNANFYFE
554	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.12	RSSQSIVHSNANYFE
555	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.13	RSSQSIVHSNANNYFE
556	HVR-L1 de Hu37D3-H9.v31.14	RSSQSIVHSNANRYFE
557	Péptido 7-24 de Tau humana	EFEVMEDHAGTYGLGDRK
558	Péptido 7-20 de Tau humana	EFEVMEDHAGTYGL
560	Región variable de cadena pesada de Hu37D3.v39 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
561	Región variable de cadena ligera de Hu37D3.v39 (VL)	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNGNTYLEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
562	HVR-H1 de Hu37D3.v39	SYGMS
563	HVR-H2 de Hu37D3.v39	TINSGGTYTYYPDSVKKG
564	HVR-H3 de Hu37D3.v39	SYSGAMDY
565	HVR-L1 de Hu37D3.v39	RSSQSIVHSNNGNTYLE
566	HVR-L2 de Hu37D3.v39	KVSNRFS
567	HVR-L3 de Hu37D3.v39	FQGSLVPWWT
568	Cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v39	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSPVPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYP PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP SSLCTKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNNAKTKPRE EQFNSTYRVRV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVTD KSRWQEGGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SLGK
569	Cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v39	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNGNTYLEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
570	Región variable de cadena pesada de Hu37D3.v40 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
571	Región variable de cadena ligera de Hu37D3.v40 (VL)	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNTNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
572	HVR-H1 de Hu37D3.v40	SYGMS
573	HVR-H2 de Hu37D3.v40	TINSGGTYTYYPDSVKKG
574	HVR-H3 de Hu37D3.v40	SYSGAMDY
575	HVR-L1 de Hu37D3.v40	RSSQSIVHSNTNTYFE
576	HVR-L2 de Hu37D3.v40	KVSNRFS
577	HVR-L3 de Hu37D3.v40	FQGSLVPWWT

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
578	Cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v40	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYL PEPVTWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NYTQKSLSL SLGK
579	Cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v40	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSLQIV HSNTNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLTSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFRNRGEC
580	Región variable de cadena pesada de Hu37D3.v41 (VH)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSS
581	Región variable de cadena ligera de Hu37D3.v41 (VL)	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSLQIV HSNGQTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IK
582	HVR-H1 de Hu37D3.v41	SYGMS
583	HVR-H2 de Hu37D3.v41	TINSGGTYTYYPDSVKG
584	HVR-H3 de Hu37D3.v41	SYSGAMDY
585	HVR-L1 de Hu37D3.v41	RSSQSIVHSNGQTYFE
586	HVR-L2 de Hu37D3.v41	KVSNRFS
587	HVR-L3 de Hu37D3.v41	FQGSLVPWT
588	Cadena pesada de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v41	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYL PEPVTWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NYTQKSLSL SLGK
589	Cadena ligera de IgG4-S228P.YTE Hu37D3.v41	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSLQIV HSNGQTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVC LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLTSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFRNRGEC
590	Cadena pesada de IgG4-S228P Hu37D3-H9.v1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGLIFR SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT INSGGTYTYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSLRAED TAVYYCANSY SGAMDYWGQG TLTVSSAST KGPSVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYL PEPVTWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGKTYTC NVDHKPSNTK VDKRVESKYG PPCPPCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLYI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NYTQKSLSL SLGK

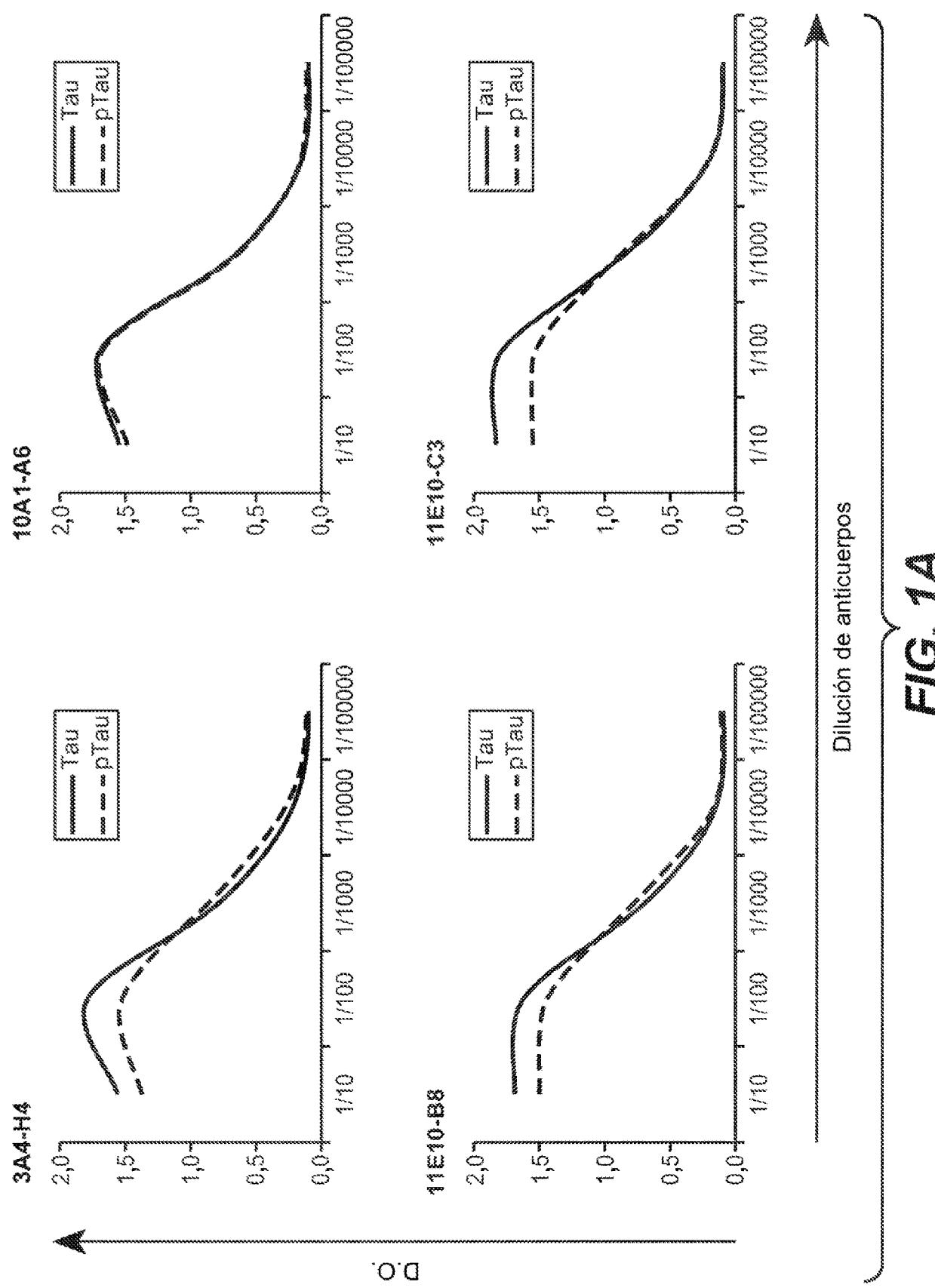
(continuación)

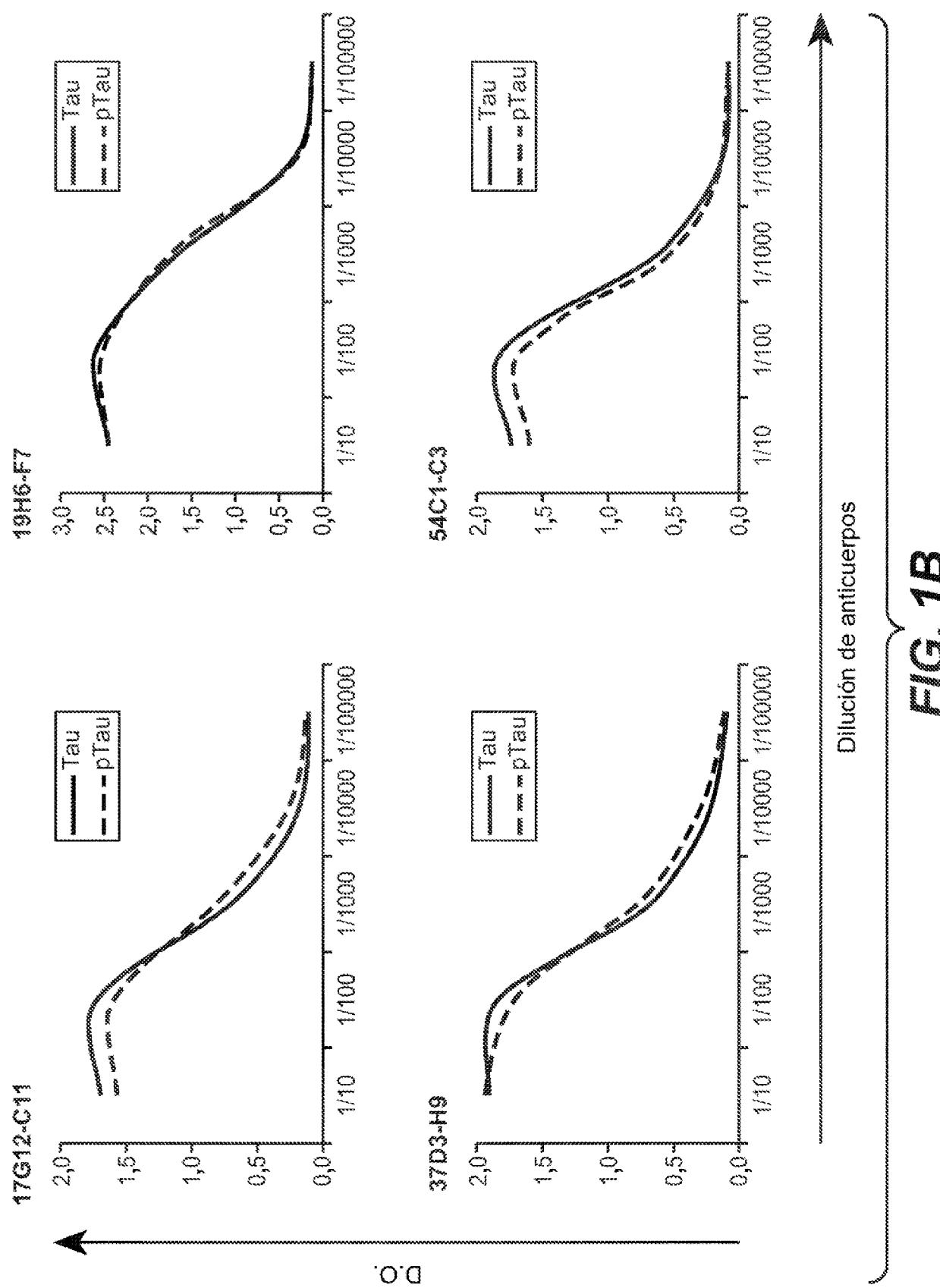
SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
591	Cadena ligera de IgG4 Hu37D3 H9.v1	EDQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HSNGNNTYFEW YQQKPGKSPK LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSLVP WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFRNREC
592	MAPT(10-24)	VMEDHAGTYGLGDRK
593	MAPT(2-24)	AEPRQEFE VMEDHAGTYGLGDRK
594	MAPT(2-34)	AEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK
595	MAPT(10-44)	VMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK
596	MAPT(2-24)Y18A	AEPRQEFE VMEDHAGTAGLGDRK
597	MAPT(2-24)L20A	AEPRQEFE VMEDHAGTYG AGDRK
598	hu113F5-F7.LC1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASRRFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FSTYPYTFGQ GTKVEIK
599	hu113F5-F7.LC2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASRRFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ FSTYPYTFGQ GTKVEIK
600	hu113F5-F7.LC3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKSPKLLIYS ASRRFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FSTYPYTFGQ GTKVEIK
601	hu113F5-F7.LC4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNVG TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASRRFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FSTYPYTFGQ GTKVEIK

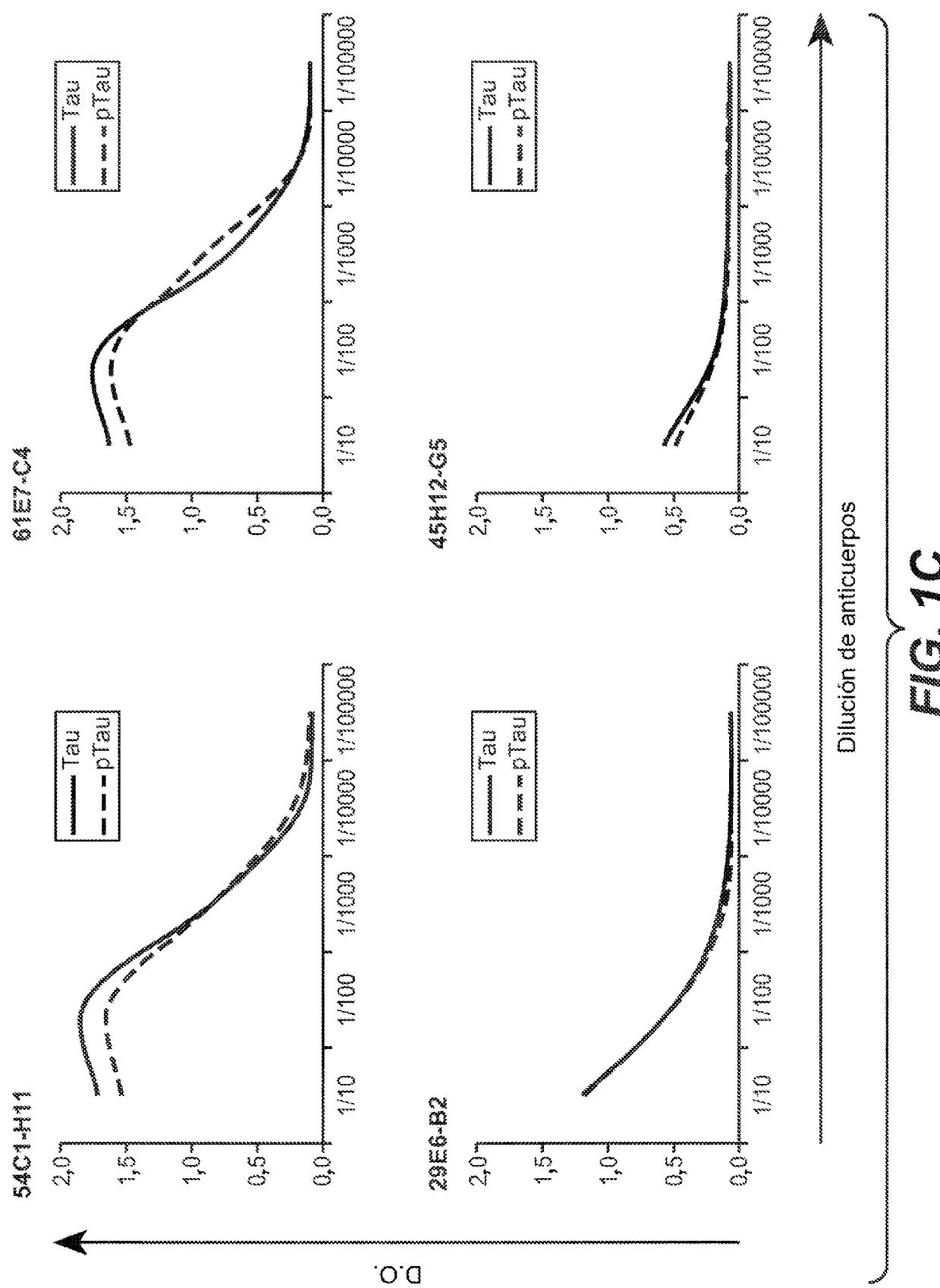
## REIVINDICACIONES

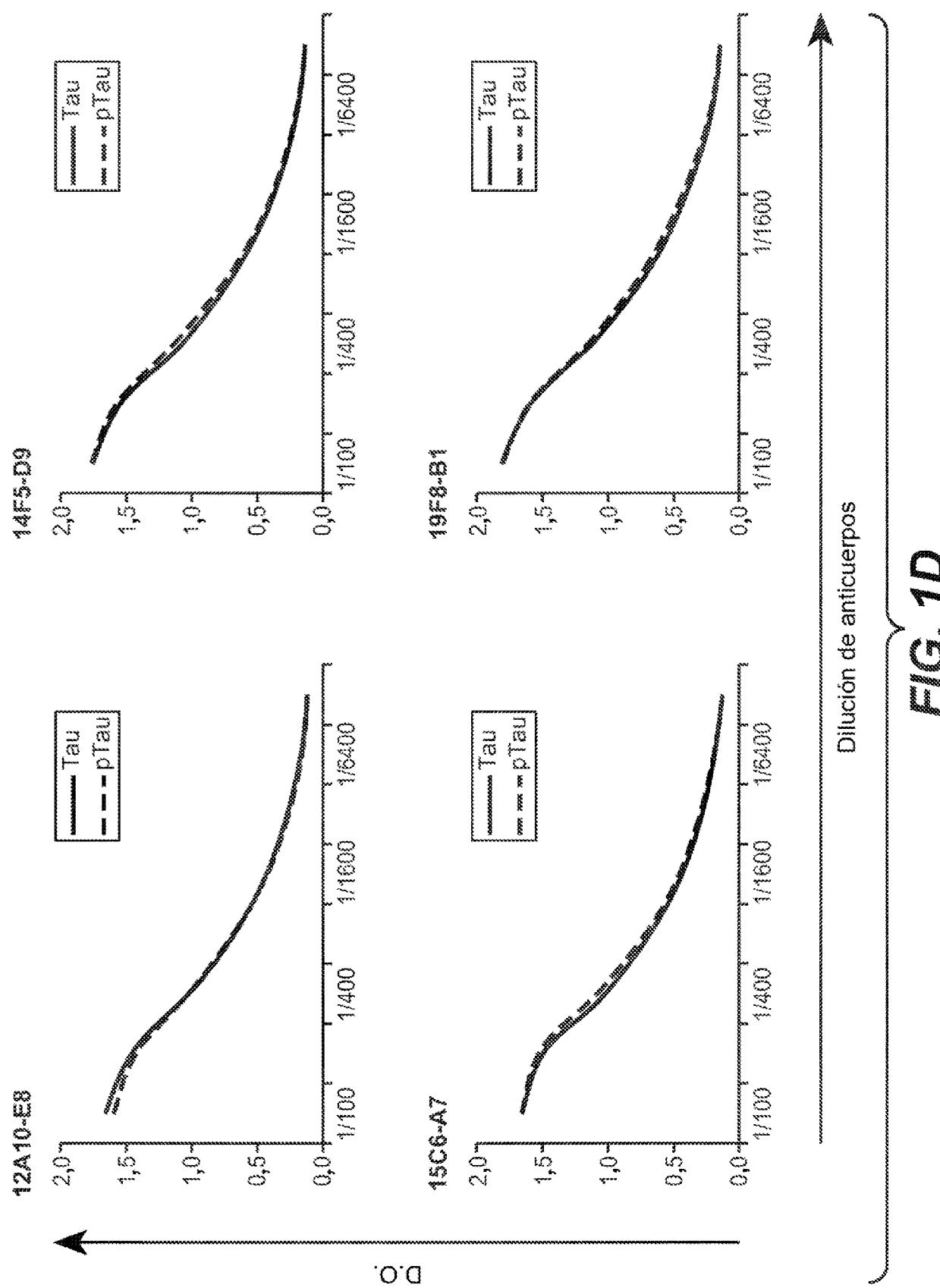
- 5        1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo se une a Tau monomérica, Tau oligomérica, Tau no fosforilada y Tau fosforilada, en donde el anticuerpo comprende HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:342; HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 343; HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 344; HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 345; HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 346; y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347.
- 10      2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:
- 15      a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 340;  
           b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 341; o  
           c) un VH como en (a) y una VL como en (b).
- 20      3. El anticuerpo monoclonal aislado humanizado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende:
- 25      a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 340;  
           b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 341; o  
           c) un VH como en (a) y una VL como en (b).
- 30      4. El anticuerpo monoclonal 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 SEQ ID NO: 340 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 341.
- 35      5. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a Tau humana.
- 40      6. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende:
- 45      a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 349; o  
           b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349.
- 50      7. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o químérico.
- 55      8. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 o uno IgG4.
- 60      9. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4.
- 65      10. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 9, en donde el anticuerpo comprende las mutaciones M252Y, S254T y T256E.
- 70      11. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el anticuerpo comprende una mutación S228P.
- 75      12. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a Tau humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 o la SEQ ID NO: 602 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 349.
- 80      13. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el anticuerpo se une a cada una de entre Tau monomérica, Tau fosforilada, Tau no fosforilada y Tau oligomérica con una  $K_D$  inferior a 50 nM.
- 85      14. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 90      15. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 14.

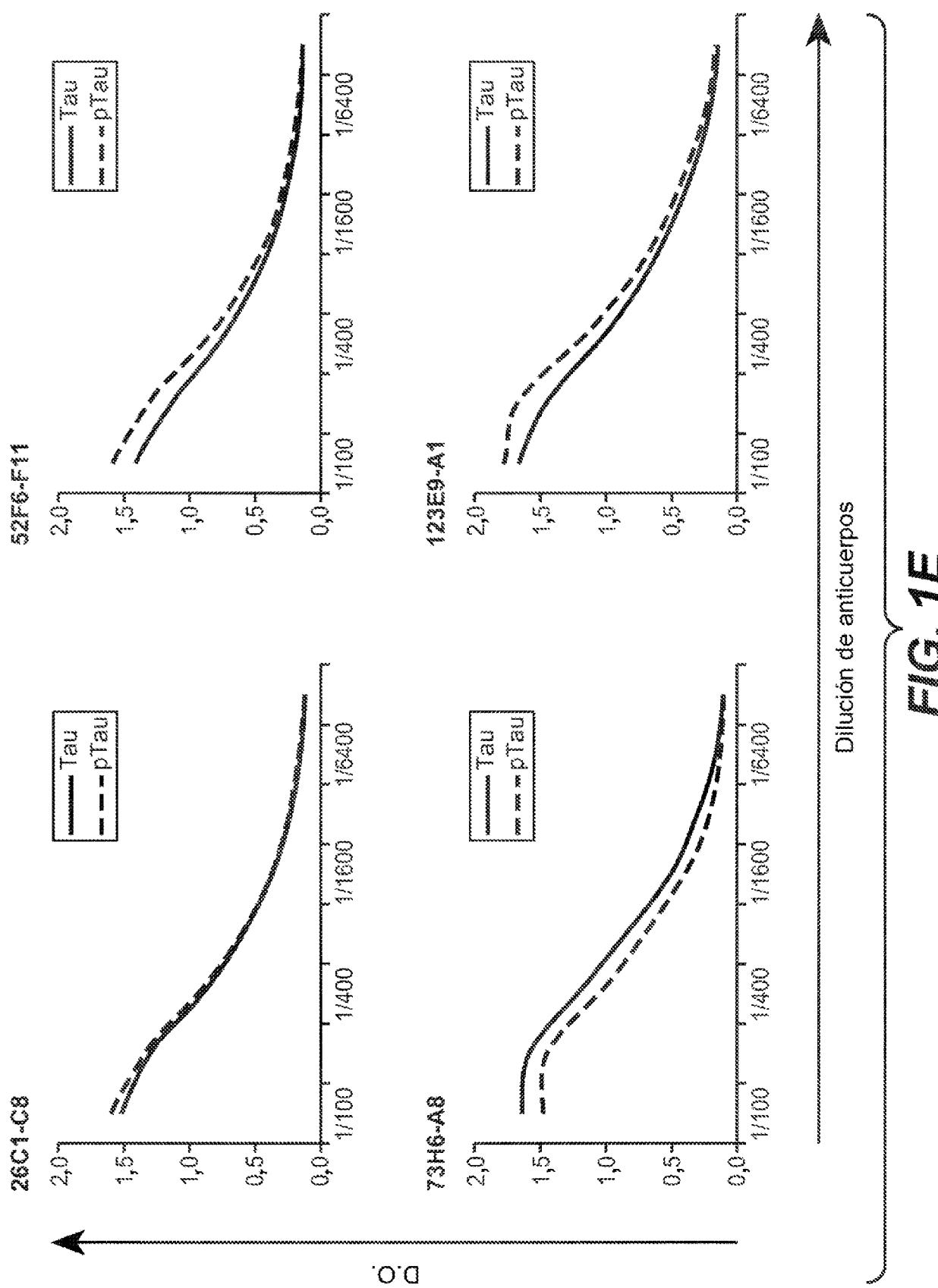
16. Un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 15 en condiciones adecuadas para producir el anticuerpo.
- 5 17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de una tauopatía.
- 10 19. El anticuerpo o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 18, en donde la tauopatía es una tauopatía neurodegenerativa.
- 20 20. El anticuerpo o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en donde la tauopatía se selecciona de la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteínas priónicas, traumatismo craneoencefálico, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con granos argirófilos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, degeneración pálido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos únicamente, parkinsonismo postencefálico y distrofia miotónica.
- 25 21. El anticuerpo o la composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer o la parálisis supranuclear progresiva.
- 30 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva o ralentizar la pérdida de memoria en un individuo.
23. El anticuerpo o la composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, en donde el tratamiento comprende administrar al menos una terapia adicional.
- 35 24. El anticuerpo o la composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 23, en donde la terapia adicional se selecciona de fármacos neurológicos, corticoesteroides, antibióticos, agentes antivíricos, anticuerpos anti-Tau, inhibidores de Tau, anticuerpos anti-beta amiloide, inhibidores de la agregación beta-amiloide, anticuerpos anti-BACE1 e inhibidores de BACE1.
- 40 25. Un método de detección de ovillos neurofibrilares, hilos neuropilares o neuritis distrófica que comprende poner en contacto una muestra con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
26. El método de la reivindicación 25, en donde la muestra es una muestra de cerebro, una muestra de líquido cefalorraquídeo o una muestra de sangre.

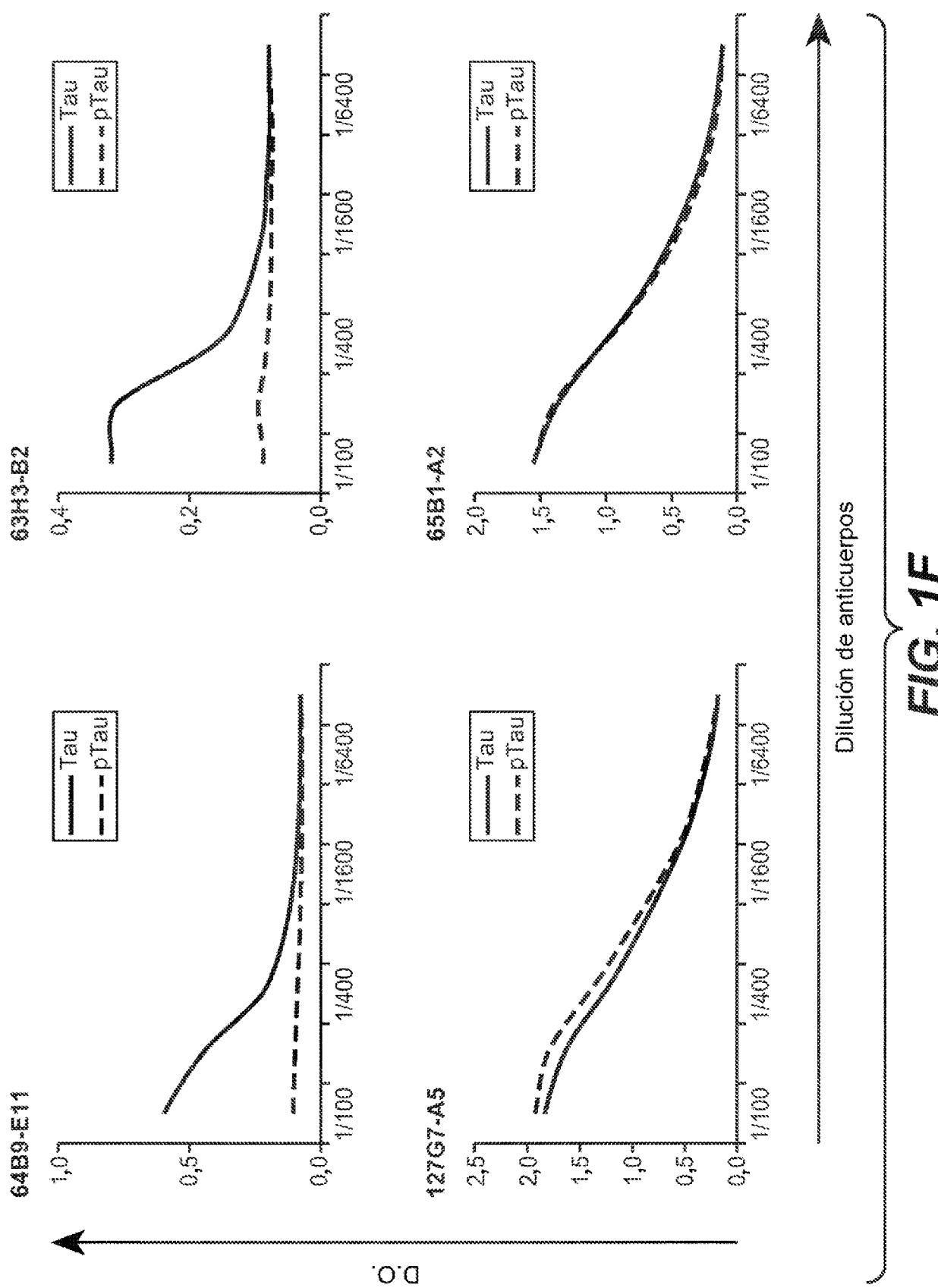


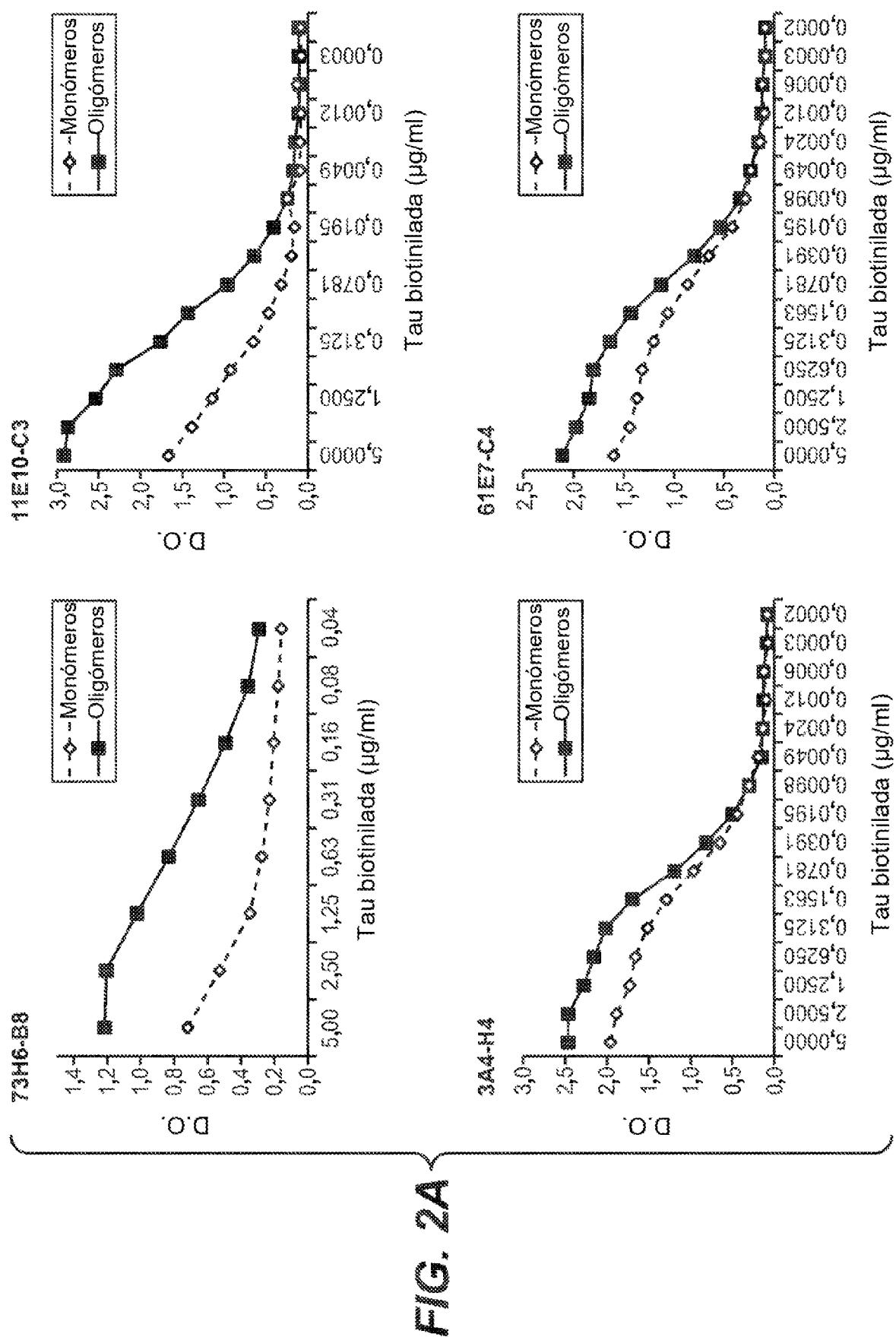












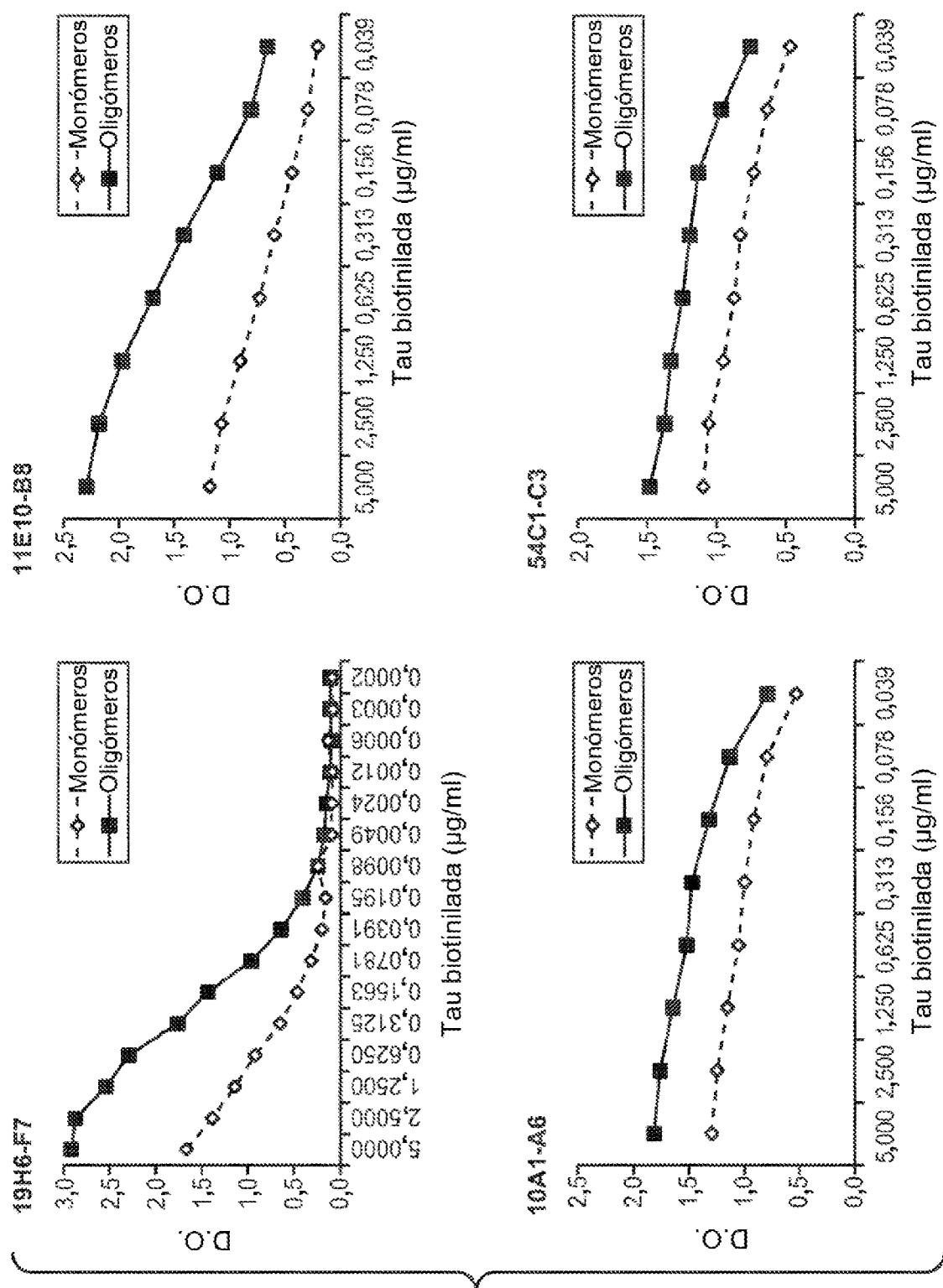
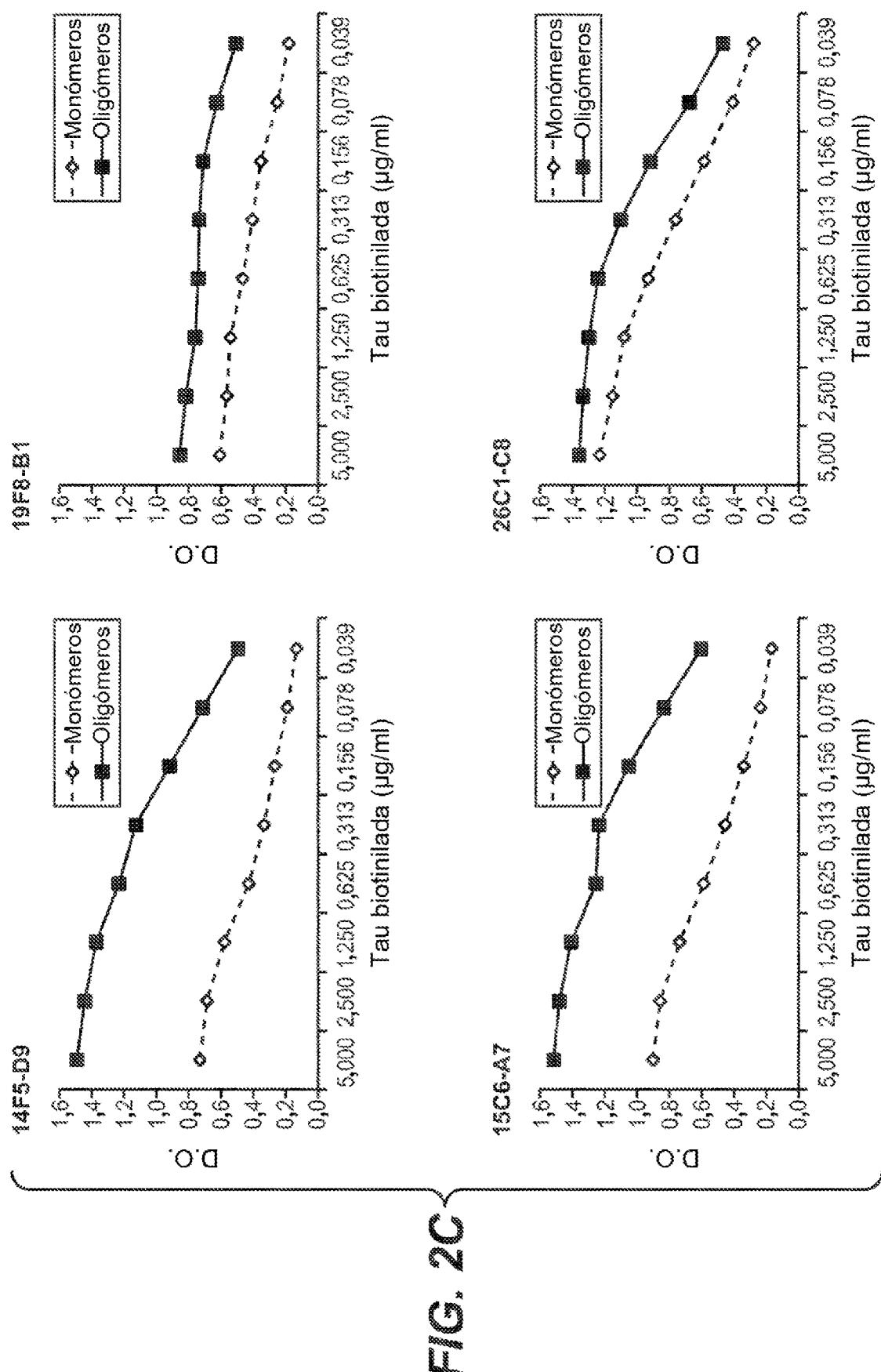
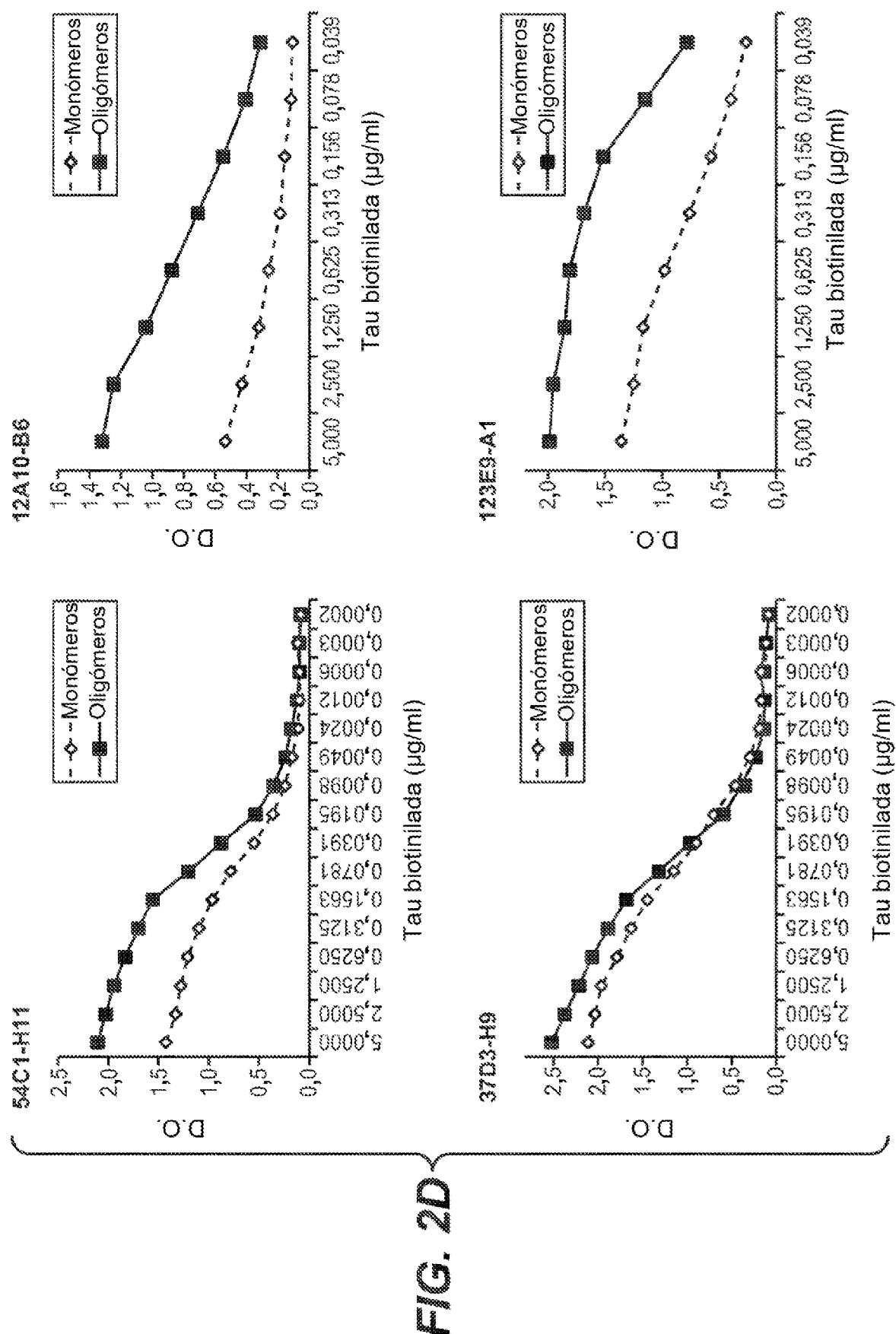


FIG. 2B





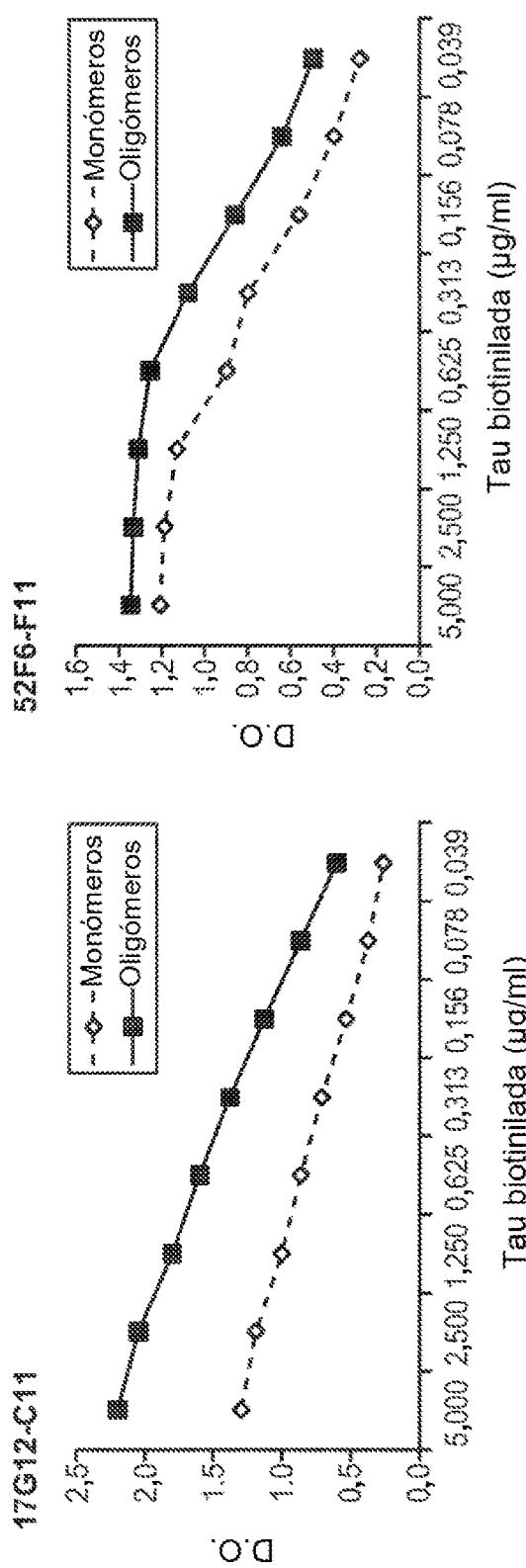


FIG. 2E

# ES 2 991 587 T3

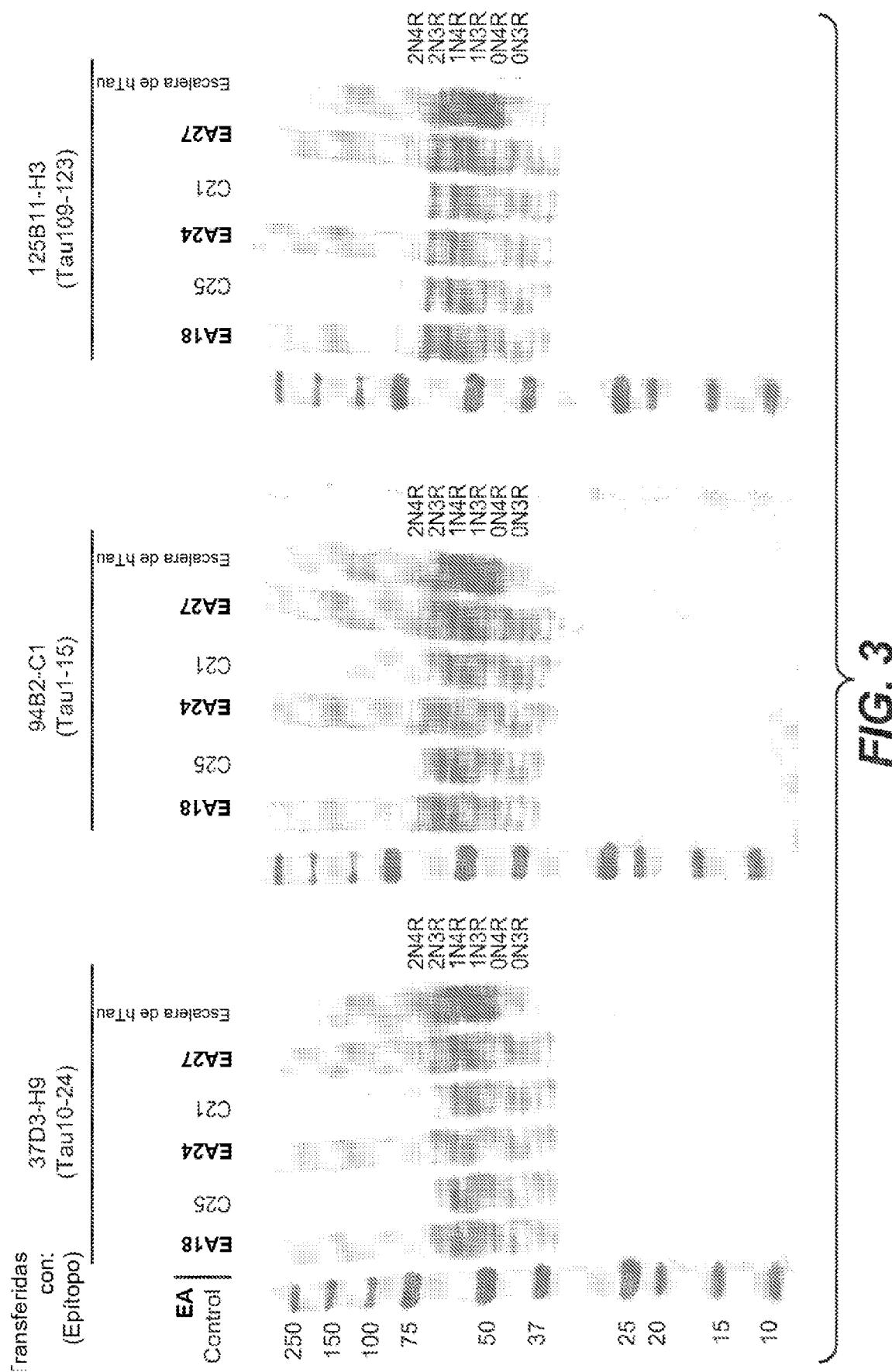
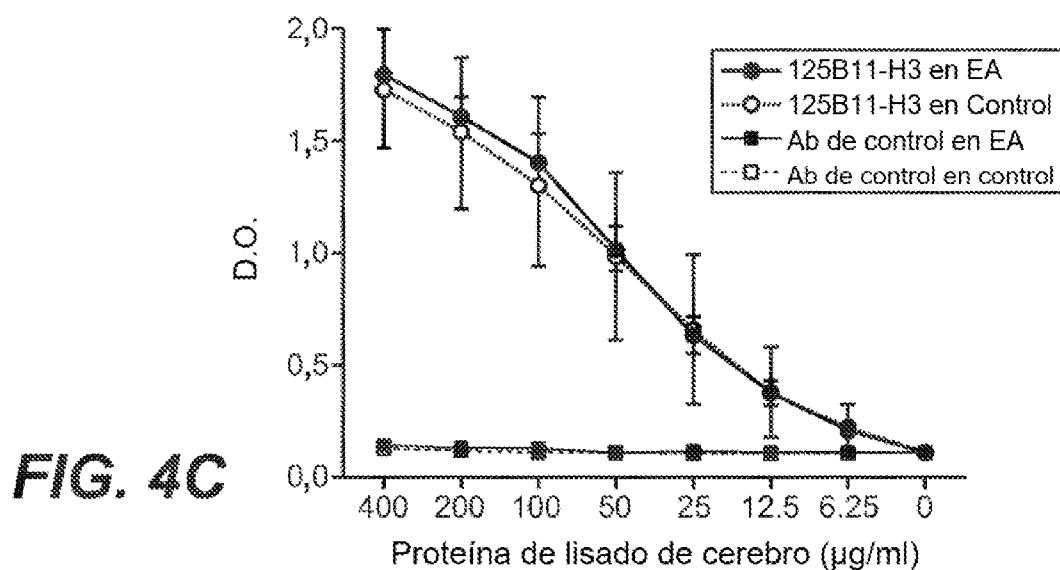
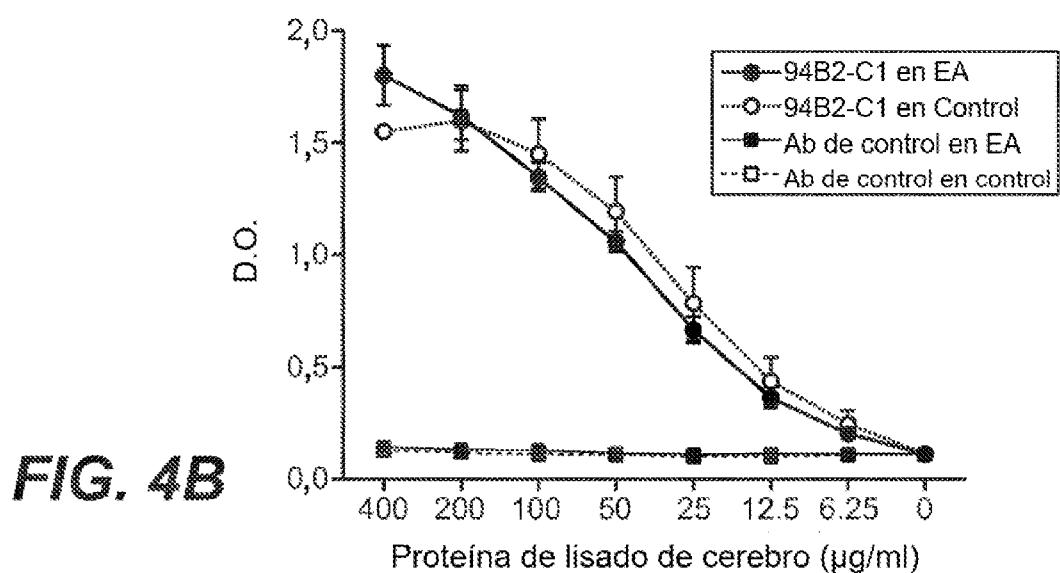
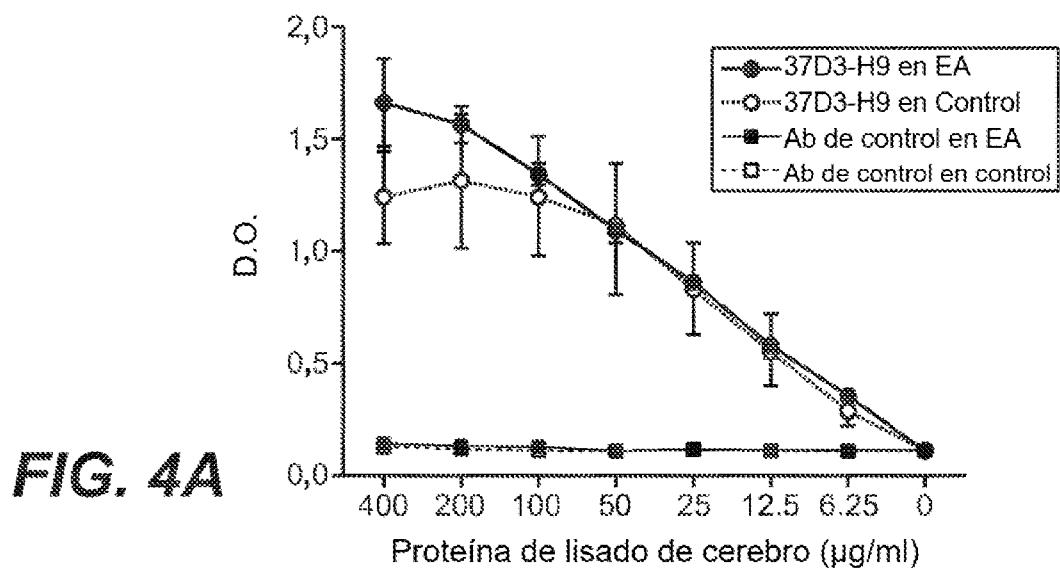


FIG. 3



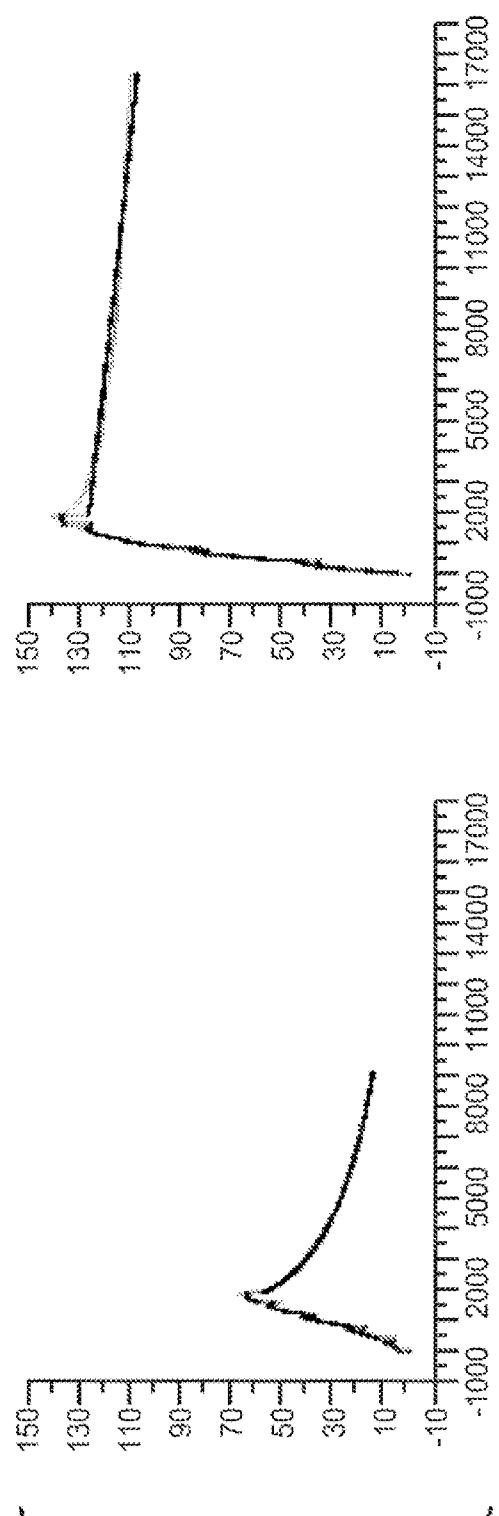


FIG. 5

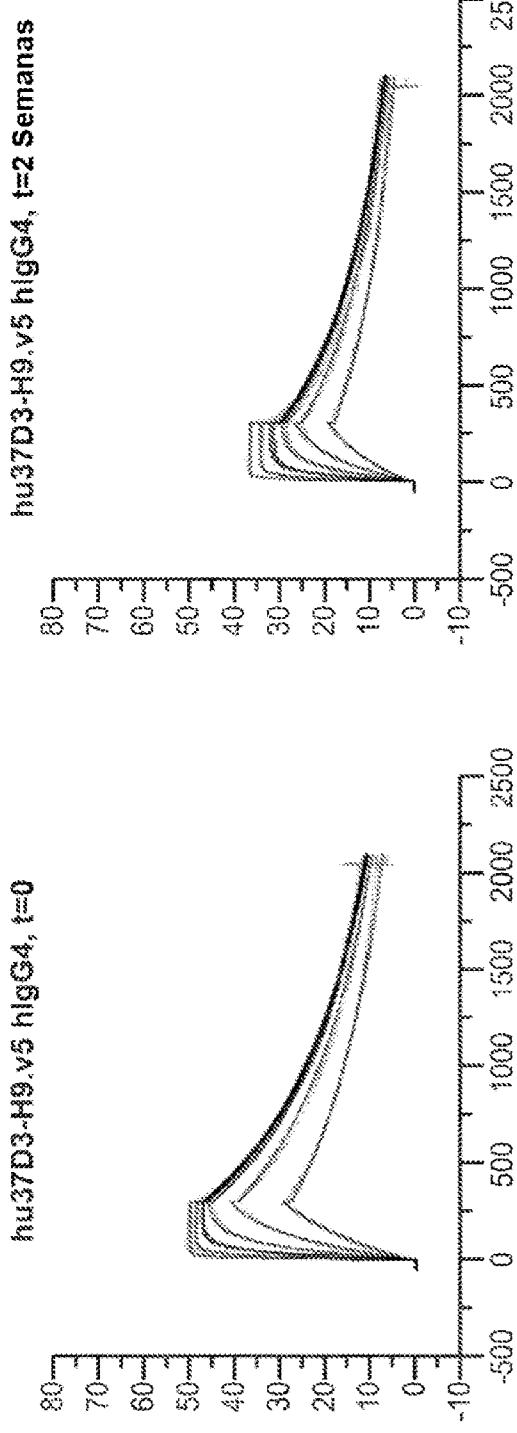
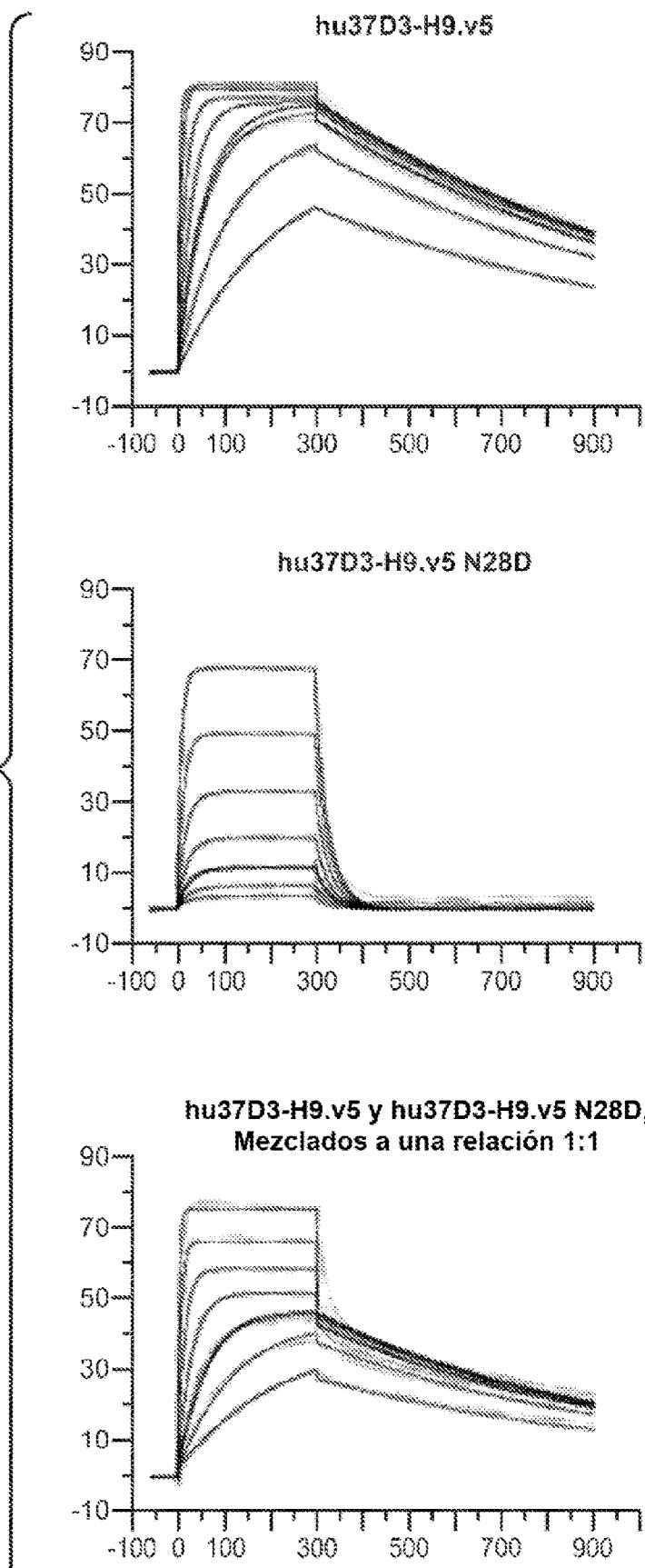


FIG. 6

**FIG. 7**



8  
EIG

84

३३

三

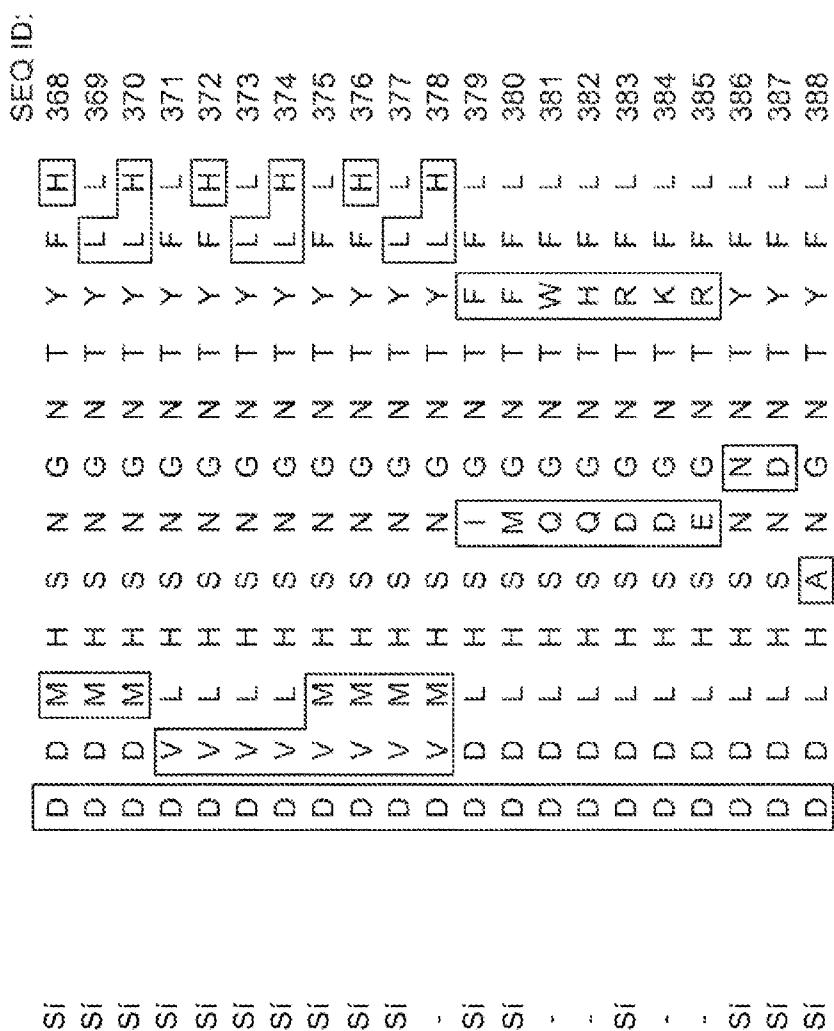
४४

Anticuerpo

Índice de estabilidad	Chi2 < 10% Rmáx y Rmáx normalizado (Pre-estrés) > 0,1?	Restos VL en ubicaciones seleccionadas (Numeración Kabat)
KD (nM)	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	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

Control sin estresar  
(mean, n=9)

hu37D3-H9.v5	0,9	73%	351
hu37D3-H9.v5.1	4,0	72%	352
hu37D3-H9.v5.2	10,9	97%	353
hu37D3-H9.v5.3	73,2	70%	354
hu37D3-H9.v5.4	36,1	78%	355
hu37D3-H9.v5.5	64,5	75%	356
hu37D3-H9.v5.6	36,6	67%	357
hu37D3-H9.v5.7	13,0	67%	358
hu37D3-H9.v5.8	2,2	90%	359
hu37D3-H9.v5.9	5,3	95%	360
hu37D3-H9.v5.10	4,7	78%	361
hu37D3-H9.v5.11	97,7	71%	362
hu37D3.v28	0,9	78%	363
hu37D3.v28.A2	32,6	72%	364
hu37D3.v28.A4	1,2	96%	365
hu37D3.v28.A6	36,3	82%	366
hu37D3.v28.A8	1,8	57%	367



hu37D3.v28.A10	41,8	37%
hu37D3.v28.A12	1,8	88%
hu37D3.v28.A14	51,4	70%
hu37D3.v28.A16	3,9	89%
hu37D3.v28.A18	17,3	83%
hu37D3.v28.A20	7,1	93%
hu37D3.v28.A22	27,8	70%
hu37D3.v28.A24	4,7	95%
hu37D3.v28.A26	22,5	78%
hu37D3.v28.A28	11,4	89%
hu37D3.v28.A30	34,4	77%
hu37D3.v28.B1	24,3	101%
hu37D3.v28.B2	31,8	83%
hu37D3.v28.B3	0,4	203%
hu37D3.v28.B4	10,5	288%
hu37D3.v28.B6	85,6	46%
hu37D3.v28.B7	4,1	607%
hu37D3.v28.B8	1,8	456%
hu37D3.v28.C1	1,4	77%
hu37D3.v28.C2	9,6	75%
hu37D3.v28.D1	5,7	73%

FIG. 8B

Anticuerpo	KD (nW)	Índice de estabilidad	Chi2 < 10% Rmáx y Rmáx normalizado (Pre-estrés) > 0,1?	Restos VL en ubicaciones seleccionadas (Numeración Kabat)												SEQ ID:
				1	2	4	27D	27E	28	29	30	31	32	33	34	
Control sin estresar (mean, n=9)	1,0	106%	Sí	E	B	L	H	S	N	G	N	T	Y	F	L	389
hu37D3.v28.E1	20,1	46%	Sí	D	D	N	S	N	G	N	T	Y	F	L	390	
hu37D3.v28.E2	22,5	28%	Sí	D	D	O	S	N	G	N	T	Y	F	L	391	
hu37D3.v28.E3	1,1	364%	-	Sí	Sí	D	S	D	C	N	Z	Z	F	L	392	
hu37D3.v28.F1	2,1	81%	Sí	Sí	Sí	N	T	T	T	T	T	T	Y	F	L	393
hu37D3.v28.F2	1,9	51%	Sí	Sí	Sí	D	S	D	C	N	Z	Z	F	L	394	
hu37D3.v28.F3	9,5	70%	Sí	Sí	Sí	N	T	T	T	T	T	T	Y	F	L	395
hu37D3.v28.S1	35,6	74%	Sí	Sí	Sí	C	C	C	C	C	C	C	Y	F	L	396
hu37D3.v28.S2	17,6	80%	Sí	Sí	Sí	R	L	Z	Z	Z	Z	Z	Y	Y	L	397
hu37D3.v28.S3	22,9	76%	Sí	Sí	Sí	H	K	S	S	S	S	S	Y	Y	L	398
hu37D3.v28.S4	24,8	82%	Sí	Sí	Sí	R	L	Z	Z	Z	Z	Z	Y	Y	L	399
hu37D3.v28.S5	2,6	82%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	400
hu37D3.v28.S6	5,4	76%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	401
hu37D3.v28.S7	4,4	88%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	402
hu37D3.v29.1	13,5	70%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	403
hu37D3.v29.2	2,6	88%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	404
hu37D3.v29.3	5,6	93%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	405
hu37D3.v29.4	4,9	76%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	406
hu37D3.v29.5	1,4	64%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	407
hu37D3.v29.6	1,4	62%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	408
hu37D3.v29.7	4,6	90%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	409
hu37D3.v29.8	40,9	77%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	410
hu37D3.v29.9	7,3	86%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	411
hu37D3.v29.10	17,4	100%	Sí	Sí	Sí	H	H	H	H	H	H	H	Y	Y	L	412

FIG. 8C

# ES 2 991 587 T3

SEQ ID:	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441
hu37D3-H9.v29.11	27,9	67%																											
hu37D3-H9.v29.12	7,0	50%																											
hu37D3-H9.v29.13	6,7	79%																											
hu37D3-H9.v29.14	22,0	92%																											
hu37D3-H9.v30.1	23,5	67%																											
hu37D3-H9.v30.2	4,2	96%																											
hu37D3-H9.v30.3	38,1	83%																											
hu37D3-H9.v30.4	22,0	87%																											
hu37D3-H9.v30.5	29,1	80%																											
hu37D3-H9.v30.6	19,1	270%																											
hu37D3-H9.v30.7	34,9	93%																											
hu37D3-H9.v30.8	31,4	105%																											
hu37D3-H9.v30.9	36,4	63%																											
hu37D3-H9.v30.10	16,1	84%																											
hu37D3-H9.v30.11	20,9	86%																											
hu37D3-H9.v31.1	41,2	72%																											
hu37D3-H9.v31.2	10,6	90%																											
hu37D3-H9.v31.3	9,8	93%																											
hu37D3-H9.v31.4	0,8	533%																											
hu37D3-H9.v31.5	15,2	85%																											
hu37D3-H9.v31.6	15,5	90%																											
hu37D3-H9.v31.7	6,9	83%																											
hu37D3-H9.v31.8	10,9	78%																											
hu37D3-H9.v31.9	7,5	81%																											
hu37D3-H9.v31.10	5,5	261%																											
hu37D3-H9.v31.11	22,7	126%																											
hu37D3-H9.v31.12	41,6	99%																											
hu37D3-H9.v31.13	48,1	83%																											
hu37D3-H9.v31.14	35,5	86%																											
- - - - -																													

FIG. 8D

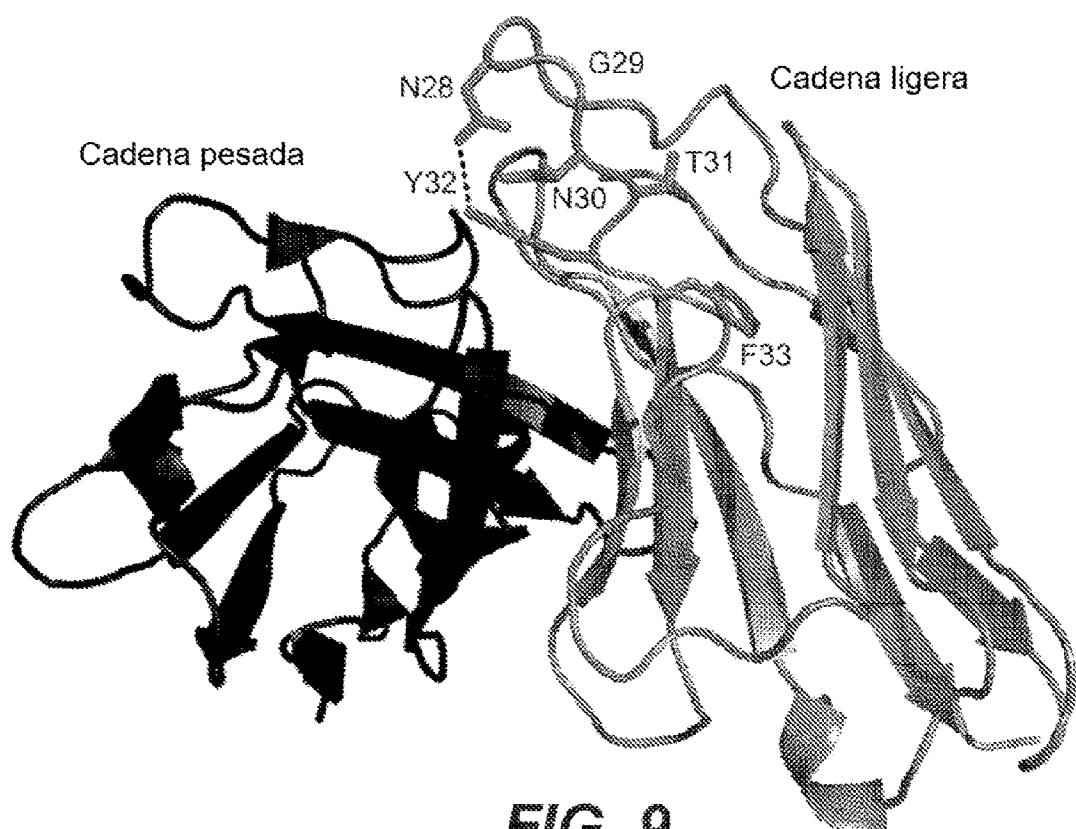


FIG. 9

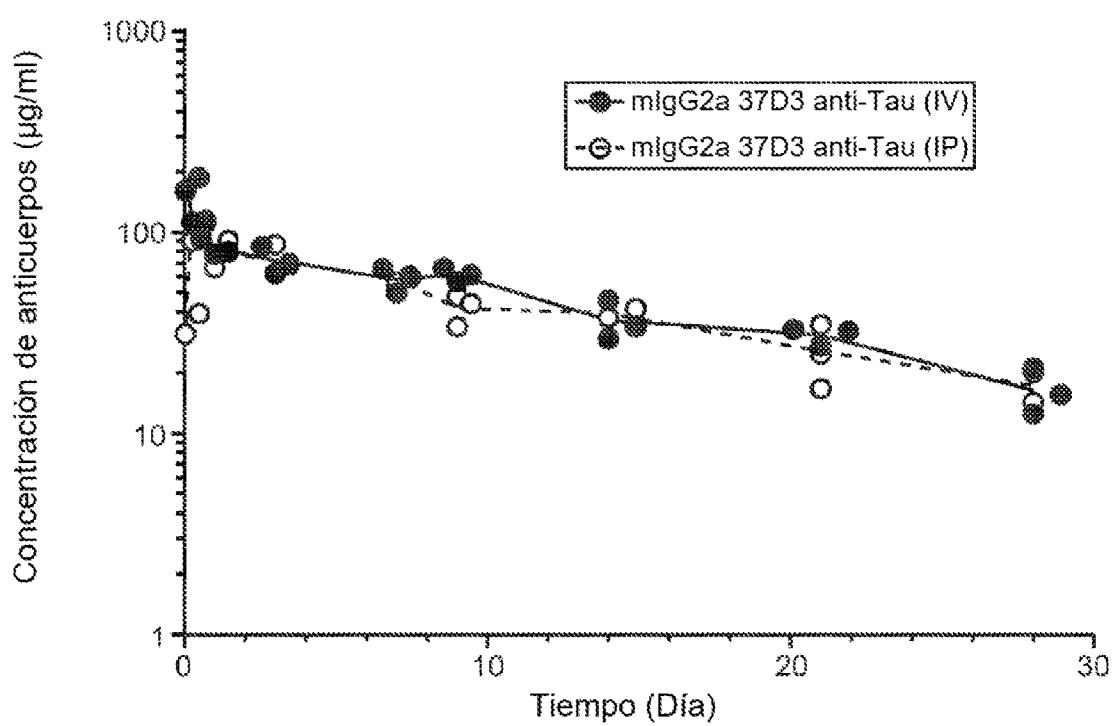


FIG. 10

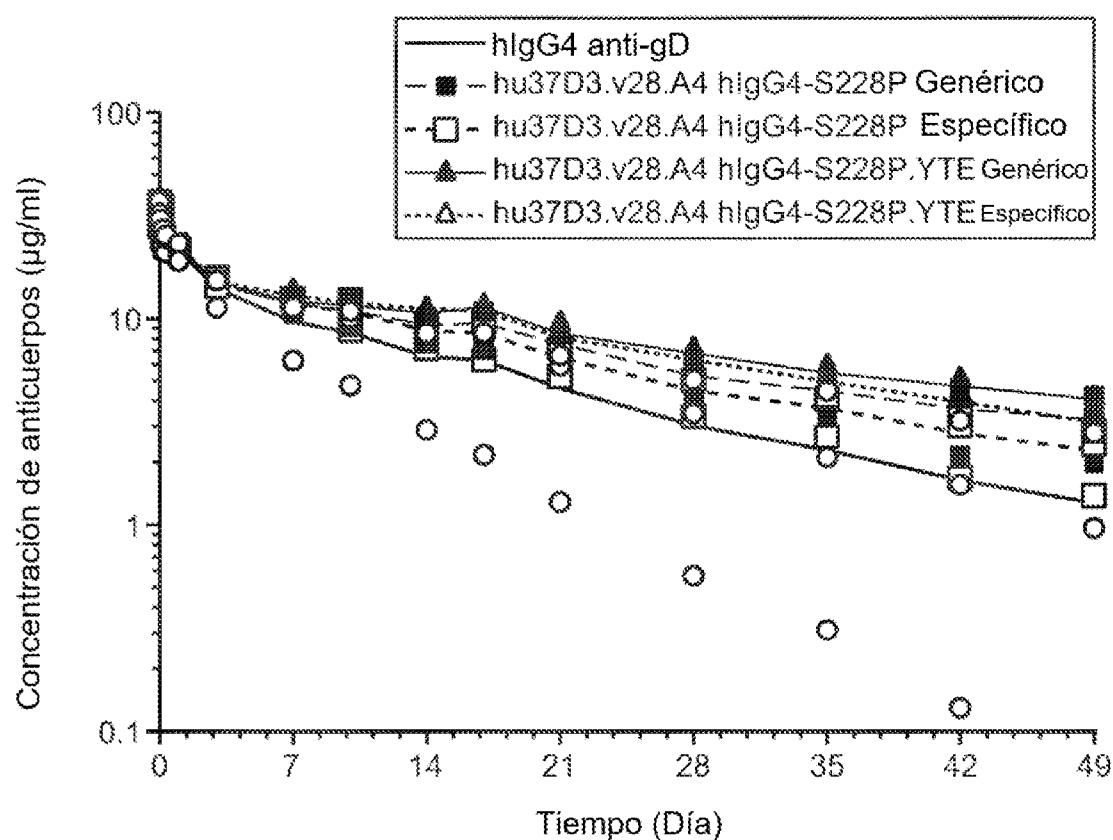


FIG. 11

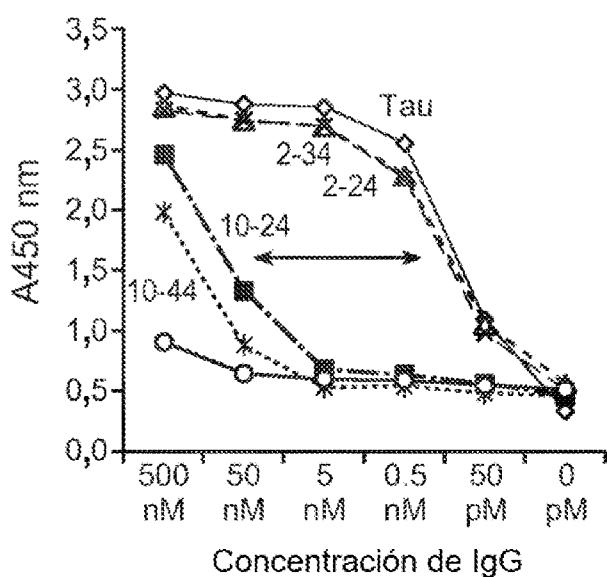


FIG. 12B

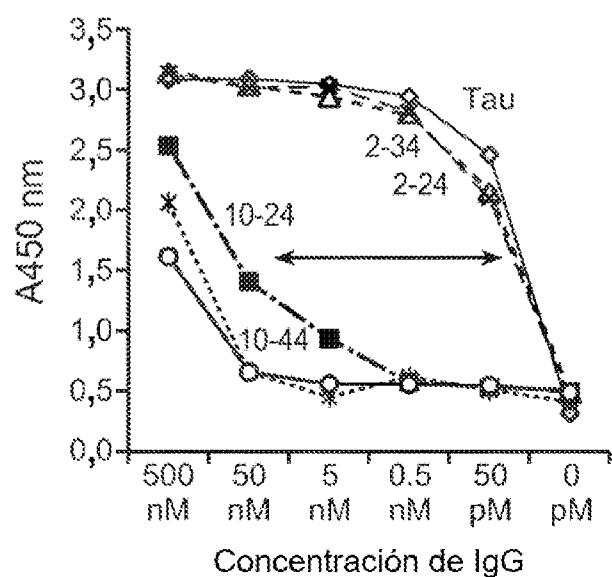


FIG. 12C

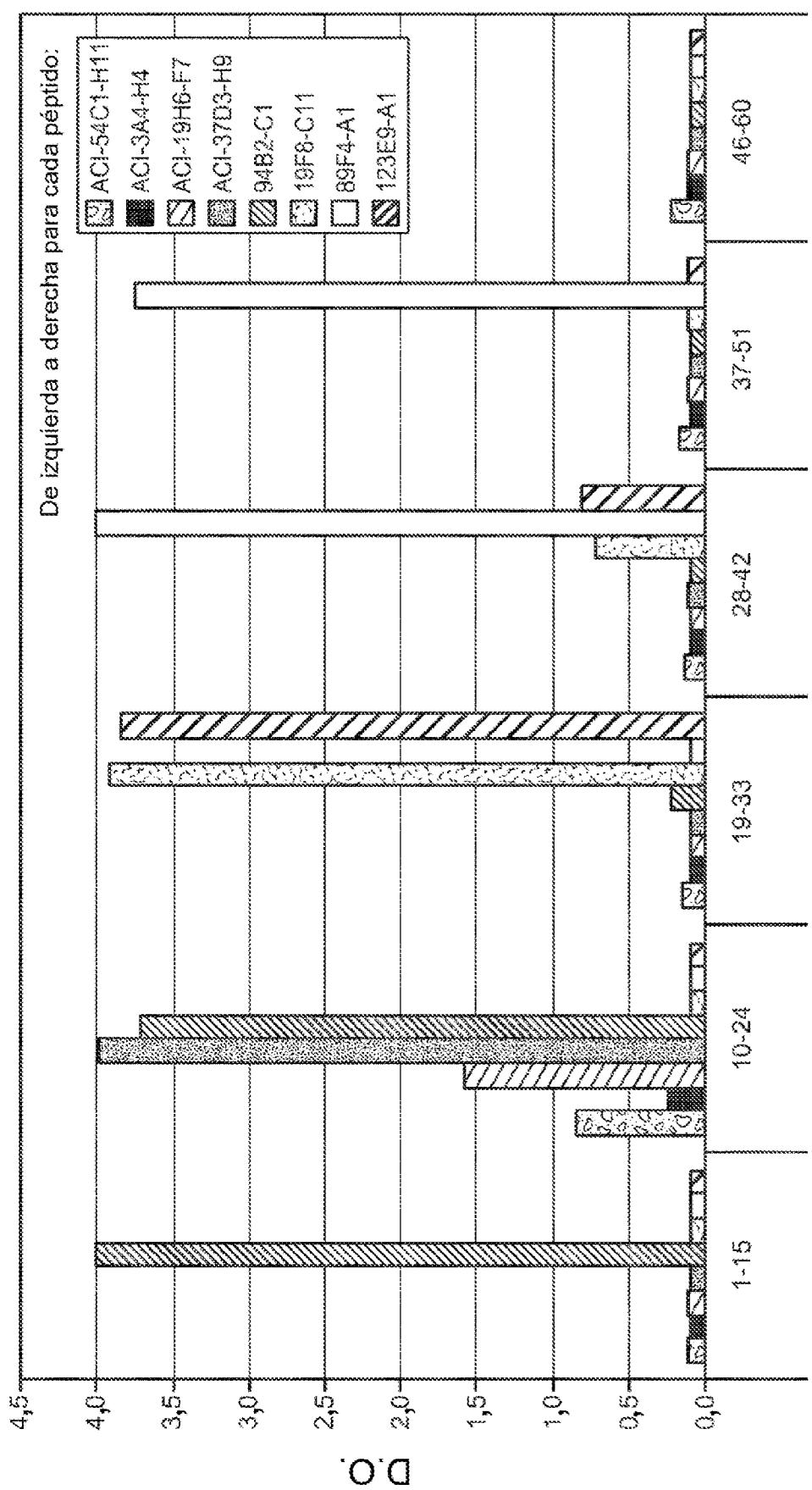
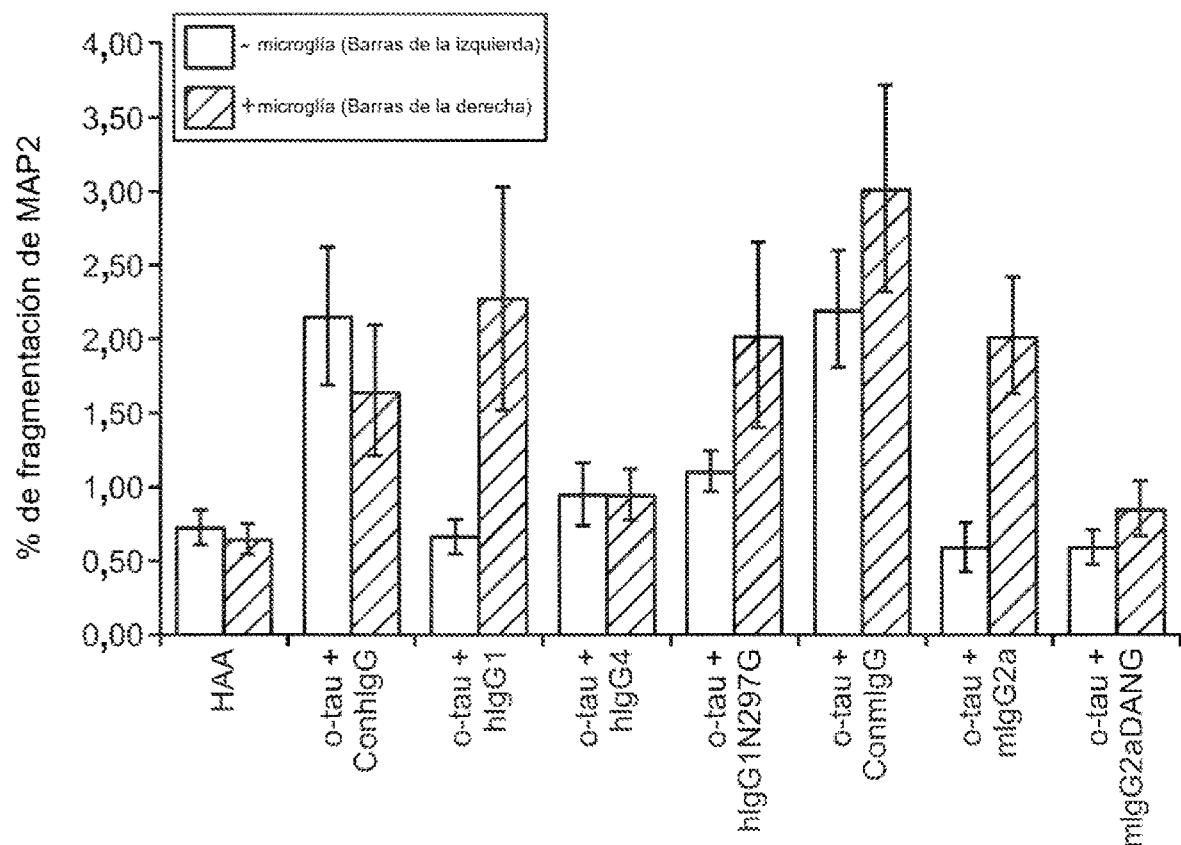
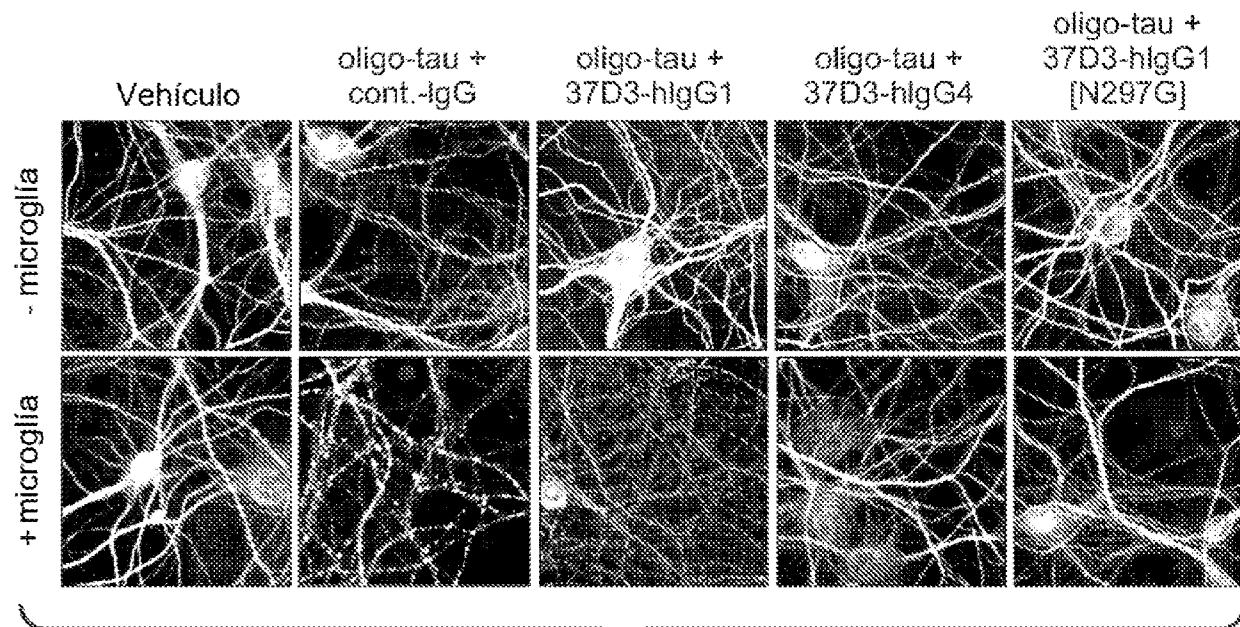


FIG. 12A

**FIG. 13A****FIG. 13B**

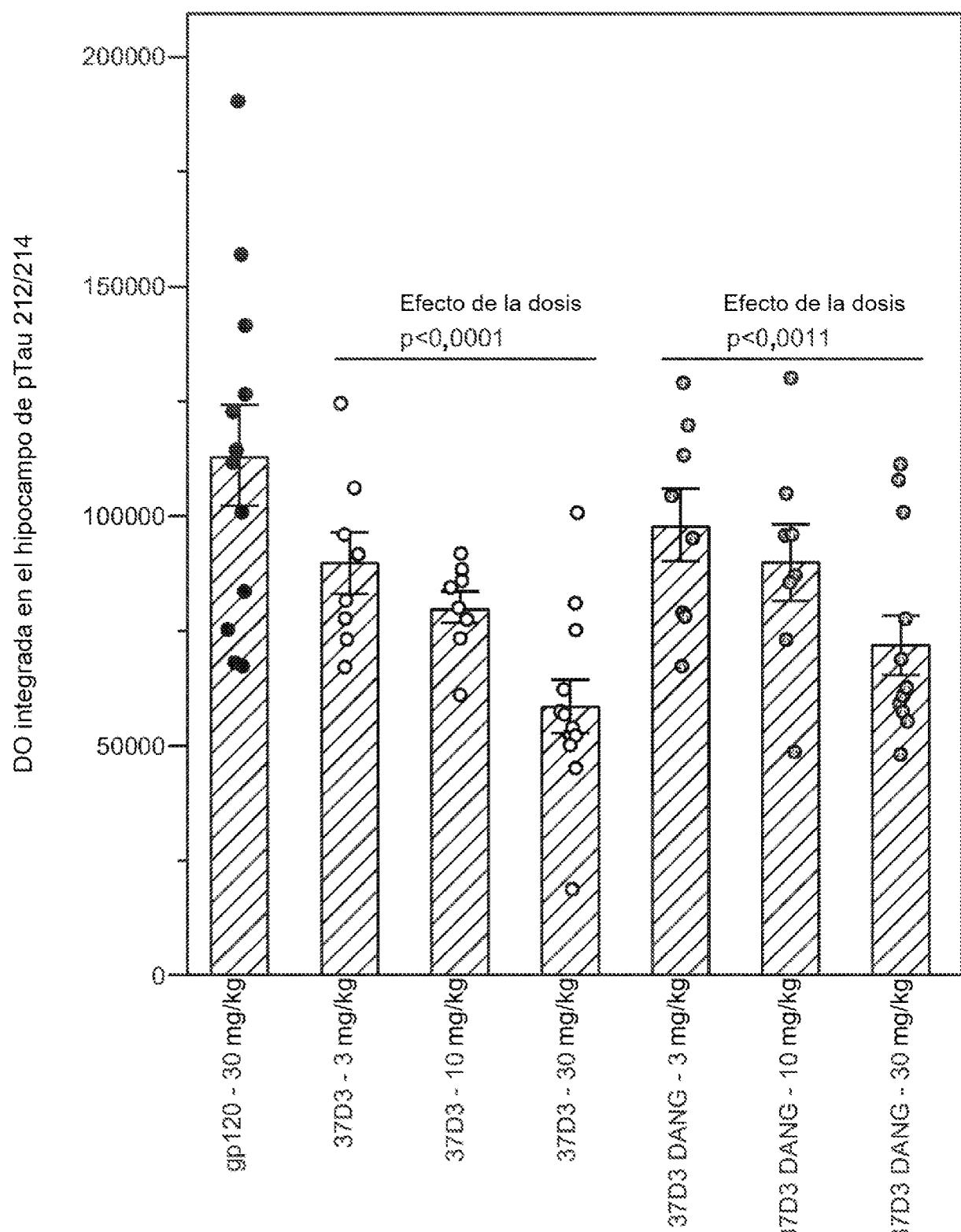
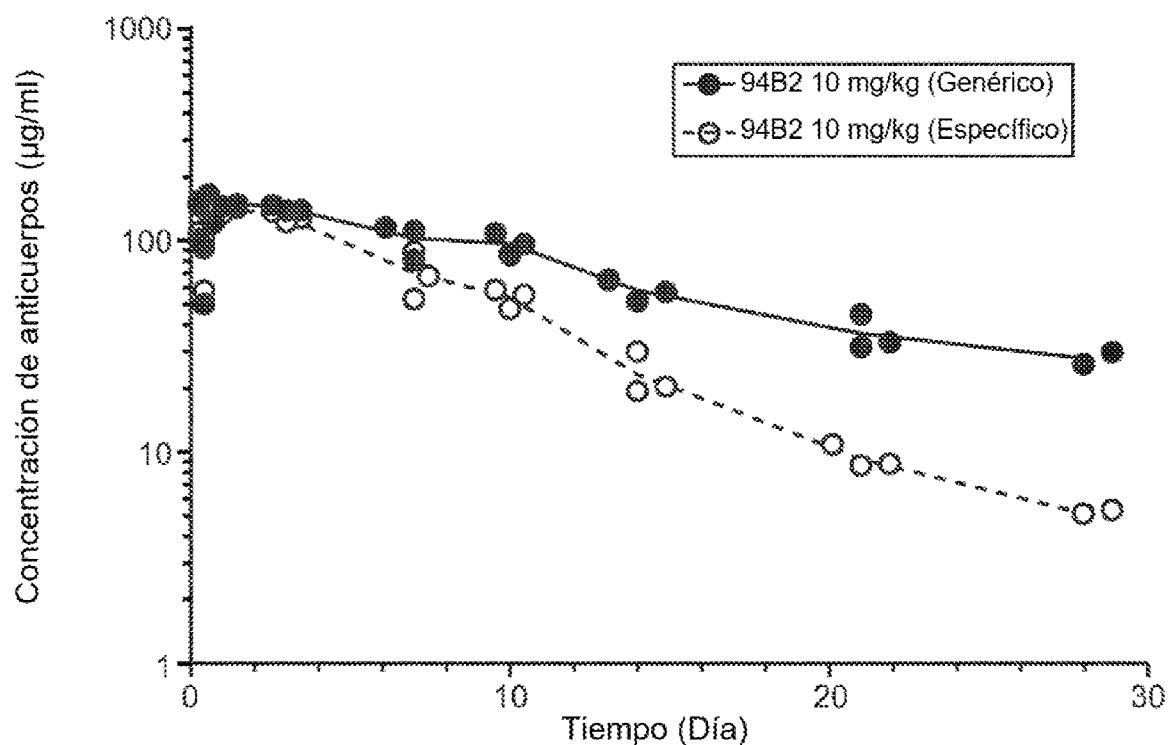
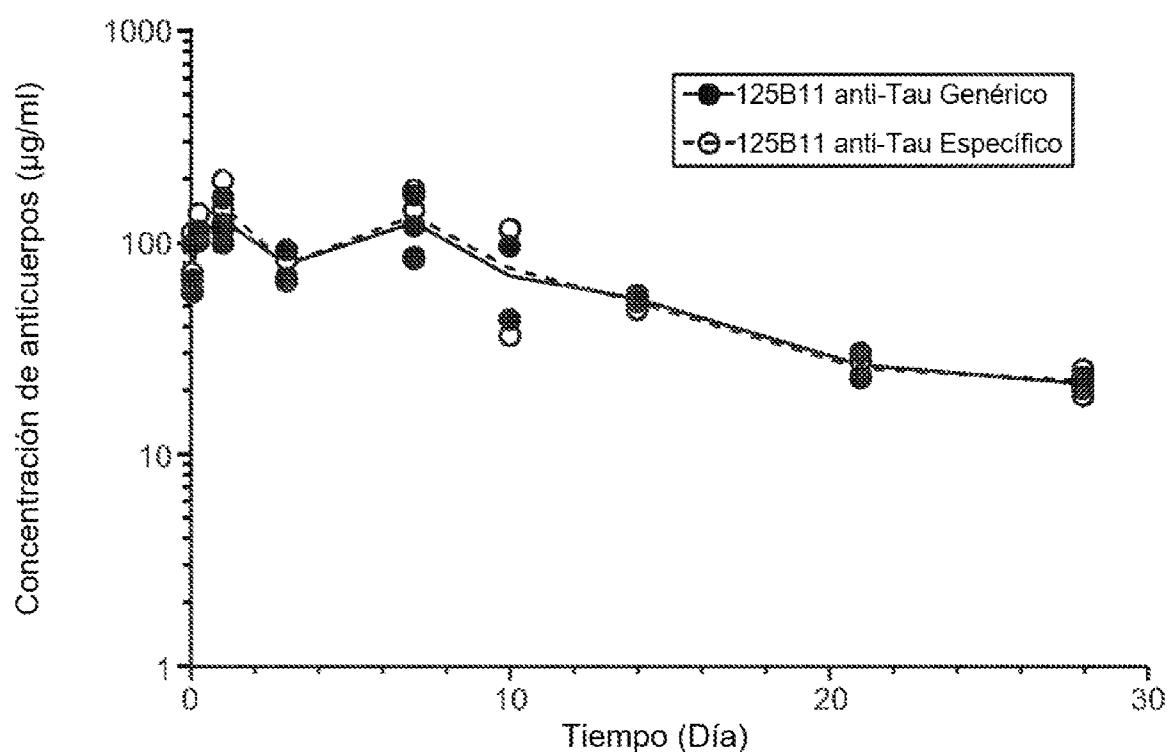


FIG. 14

Posición 2 de Tau nativa

↓ Epitopo de 37D3 (2-24)

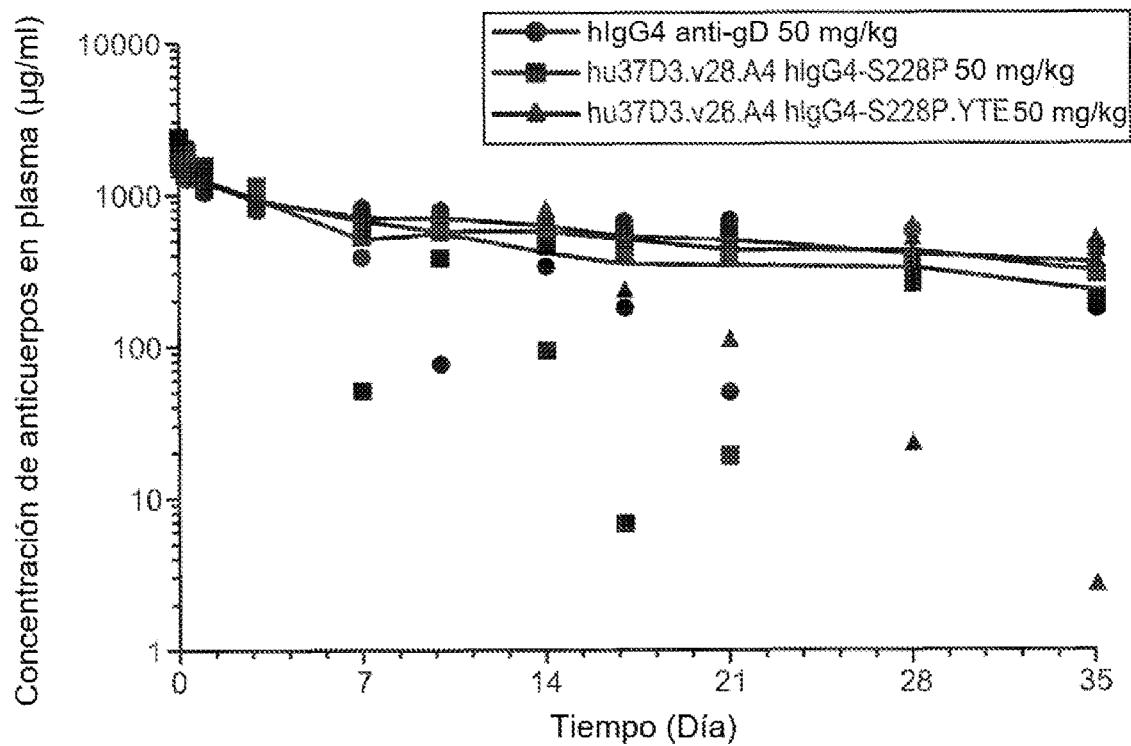
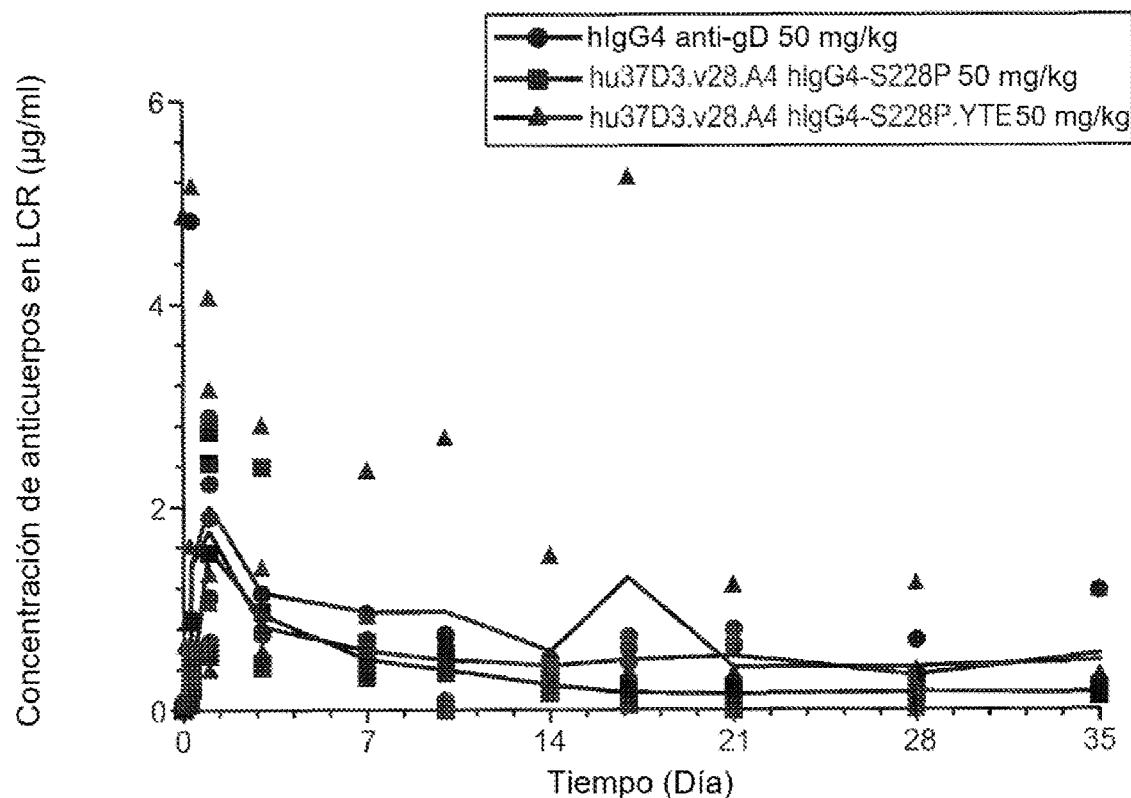
PRO364486.HU	1	MHHHHHHGENLYFQGSAEPRQEEV	EDHAGTYGLGDRKDG	GGYTNNHQDQ	50					
PRO378546.CYNO	1	MHHHHHHGENLYFQGSAEPRQEE	EDV	EDHAGTYGLGDRKDG	EQYTMHQDQ	50				
PRO364486.HU	51	EGDTDAGLKE	SPLQ	ETIEDGSS	EPGSSETSDAKS	STPTAEDV	PLVDE	GAP	100	
PRO378546.CYNO	51	EGDTDAGLKE	SPLQ	PAE	DGSEELG	SETSDAKS	STPTAEDV	PLVDE	GAP	100
PRO364486.HU	101	GEQAAAQPH	EEIPEGTTAEEAGIGD	TPSLED	DEAAGHVTQ	ARMVSK	KDGT	150		
PRO378546.CYNO	101	GEQAAAQPH	EEIPEGTTAEEAGIGD	TPSLED	DEAAGHVTQ	ARMVSK	KDGT	150		
PRO364486.HU	151	GSDDKKAKGADGK	TKIATPRGAA	APPGQKGQ	ANATRIPAKT	PPAKT	PPSS	200		
PRO378546.CYNO	151	GSDDKKAKGADGK	TKIATPRGAA	APPGQKGQ	ANATRIPAKT	PPAKT	PPSS	200		
PRO364486.HU	201	GEPPKS	SGDRSGYSSPGSS	PGT	PGSRSRTPS	TPSLPTP	PPKS	250		
PRO378546.CYNO	201	GEPPKS	SGDRSGYSSPGSS	PGT	PGSRSRTPS	TPSLPTP	PPKS	250		
PRO364486.HU	251	PSSSAKSRLQ	TAPVPM	PD	LKNVSKIG	STENLKHQ	OPGGCKVQI	INKKLDLS	300	
PRO378546.CYNO	251	PSSSAKSRLQ	TAPVPM	PD	LKNVSKIG	STENLKHQ	OPGGCKVQI	INKKLDLS	300	
PRO364486.HU	301	NVQSKCGSKDN	IKHVPGG	SV	QIVYKPV	VLSKVTSKCGS	LGNIHHKPGGG	350		
PRO378546.CYNO	301	NVQSKCGSKDN	IKHVPGG	SV	QIVYKPV	VLSKVTSKCGS	LGNIHHKPGGG	350		
PRO364486.HU	351	QVEVKSEKLD	EKDRVQSKIG	SLDN	ITVPGGG	NNKKIE	THKLTERENAKAK	400		
PRO378546.CYNO	351	QVEVKSEKLD	EKDRVQSKIG	SLDN	ITVPGGG	NNKKIE	THKLTERENAKAK	400		
PRO364486.HU	401	TDHGA	EIVYKSPVVSGD	TSPRHLSNV	SSTG	SIDMVDS	PQLATLAD	EV	450	
PRO378546.CYNO	401	TDHGA	EIVYKSPVVSGD	TSPRHLSNV	SSTG	SIDMVDS	PQLATLAD	EV	450	
PRO364486.HU	451	LAQGL	456	SEQ ID NO: 1						
PRO378546.CYNO	451	LAQGL	456	SEQ ID NO: 3						

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

## Región variable de cadena pesada

ES 2 991 587 T3

FIG. 18

**FIG. 19A****FIG. 19B**

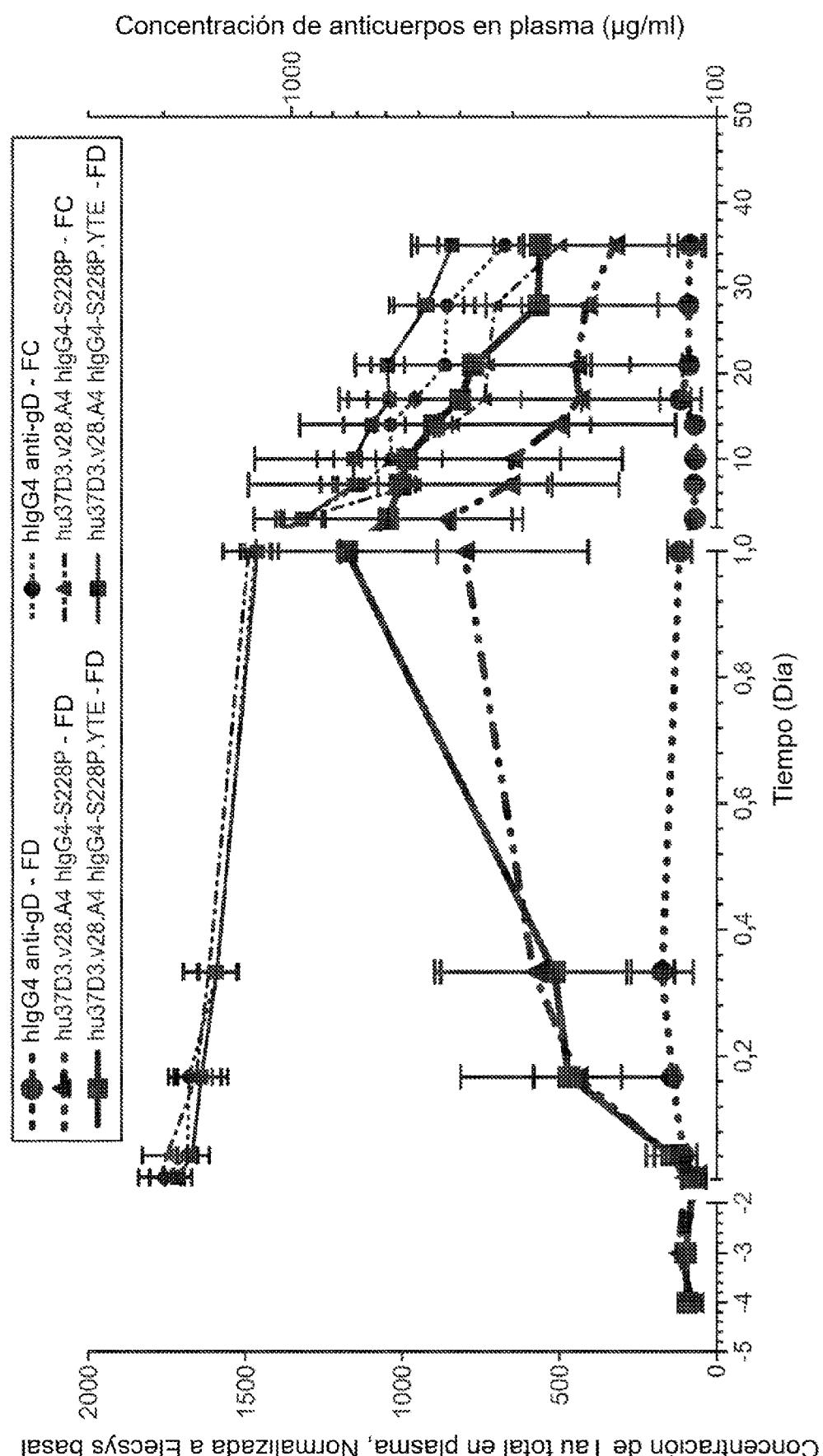


FIG. 20

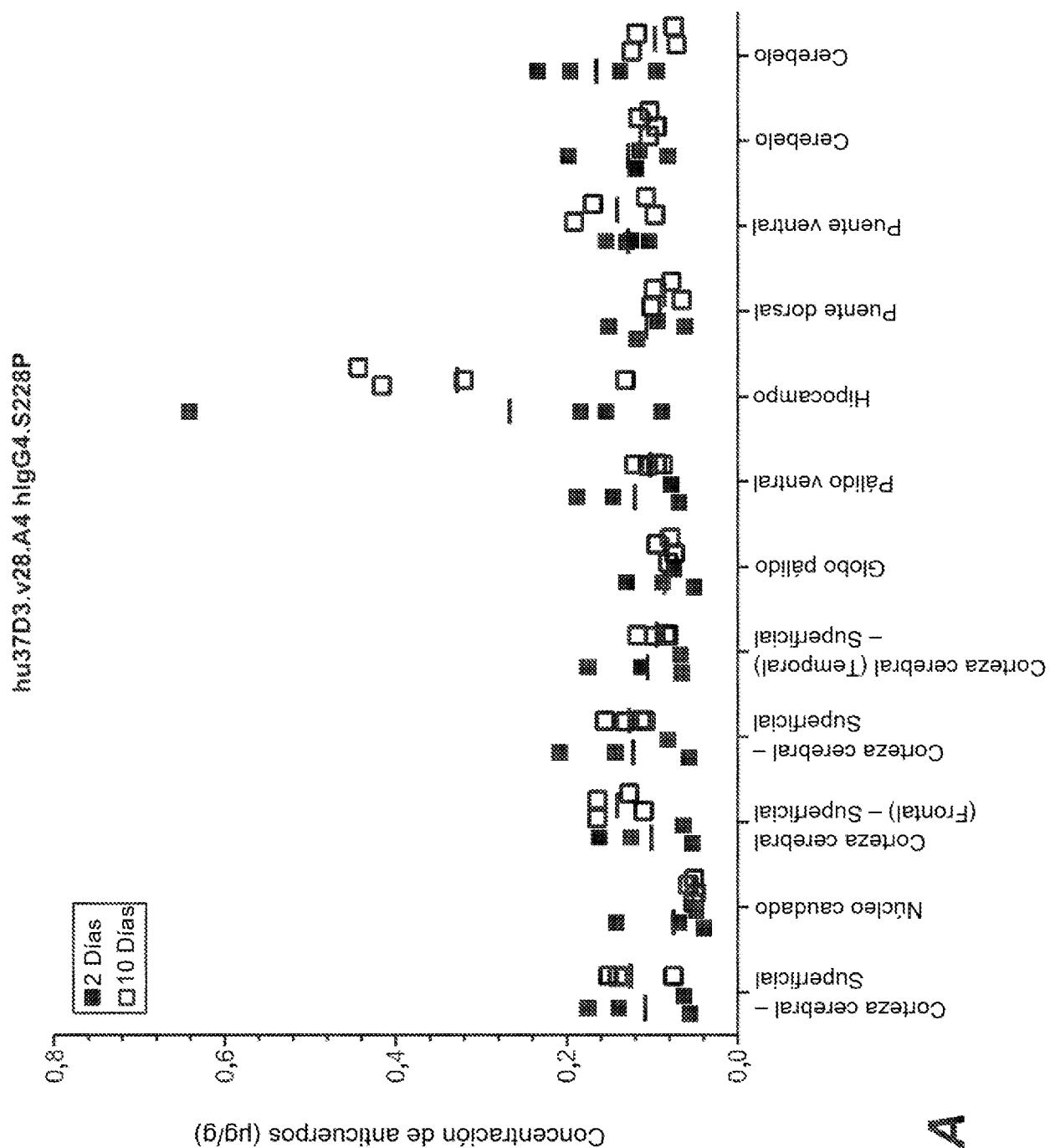


FIG. 21A

hu37D3.v28.A4 IgG4.S226P.YTF

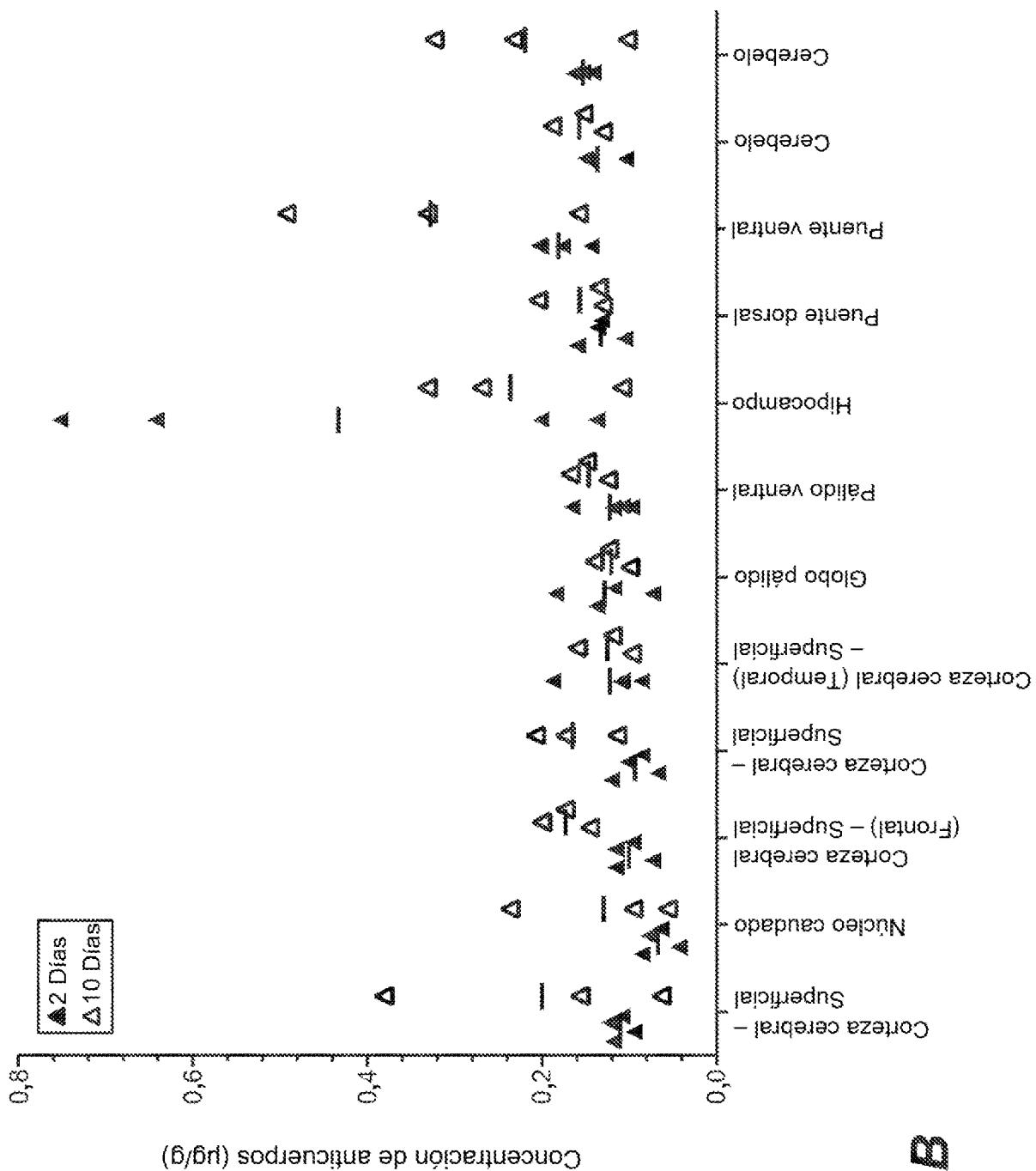


FIG. 21B

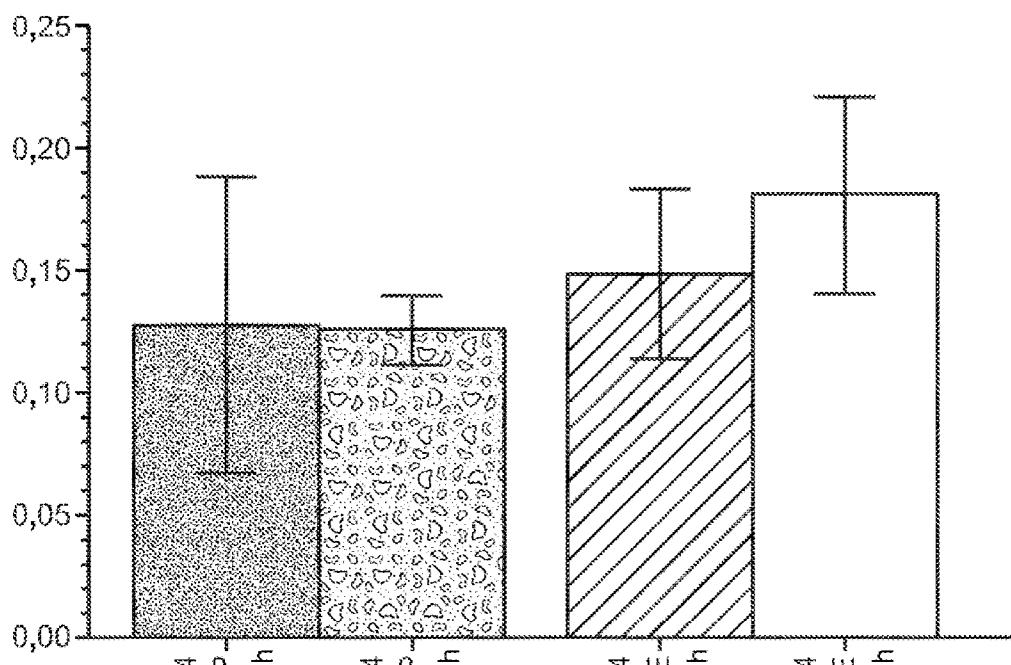
Concentración de anticuerpos ( $\mu\text{g/g}$ )

FIG. 21C

% de concentración de anticuerpos en cerebro:plasma

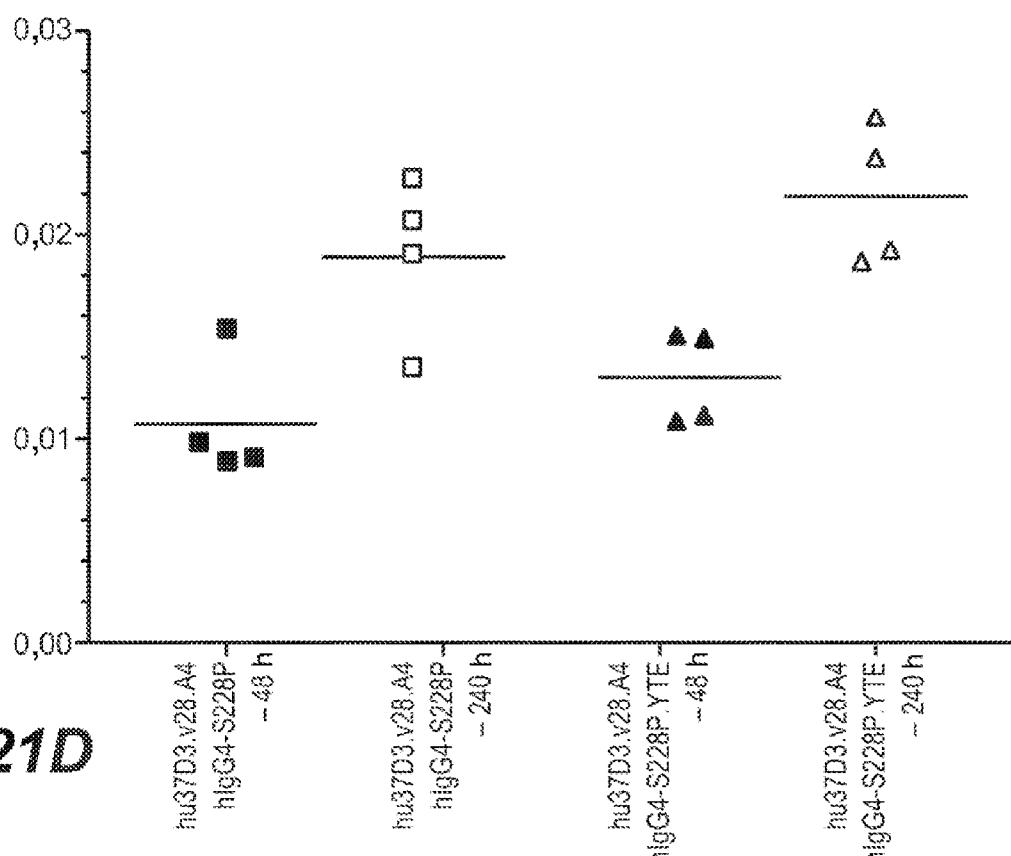
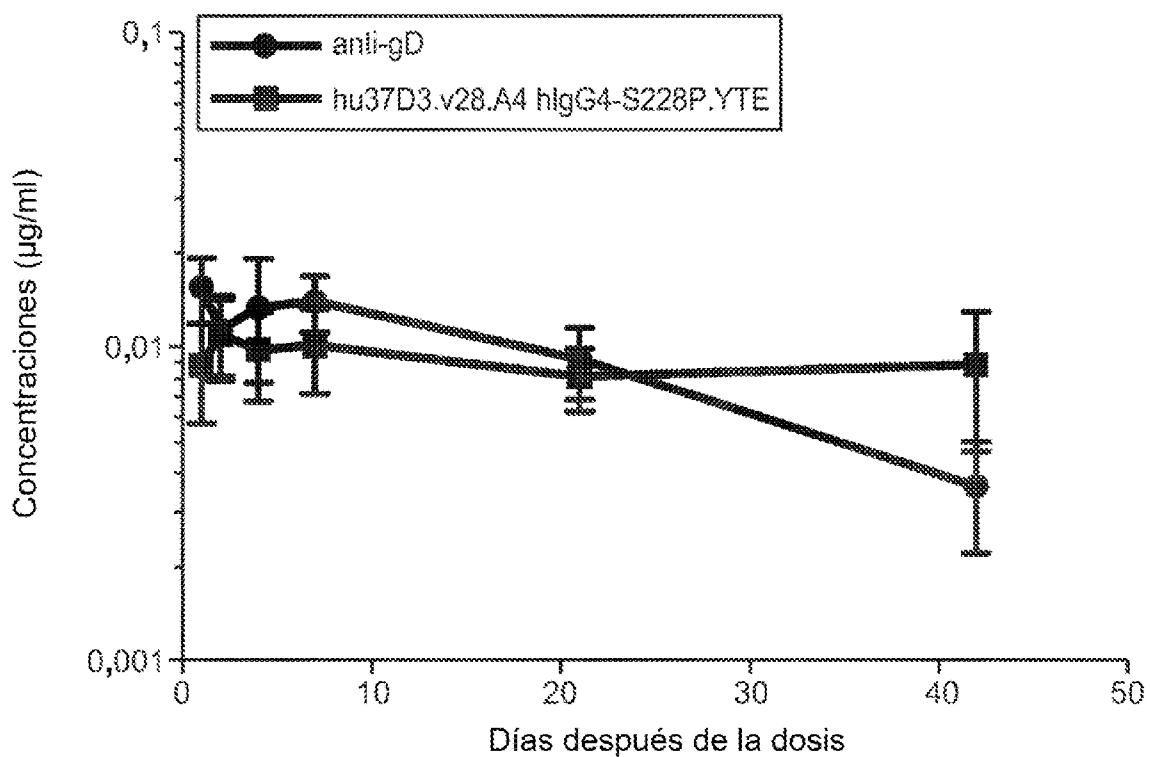
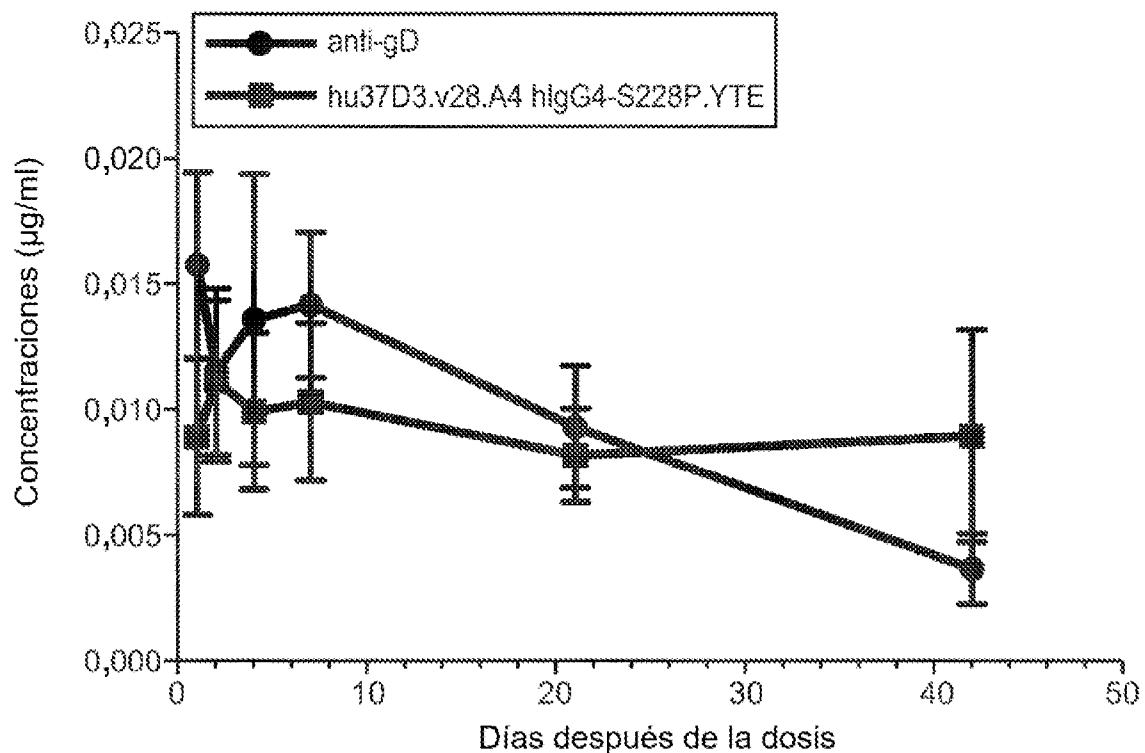


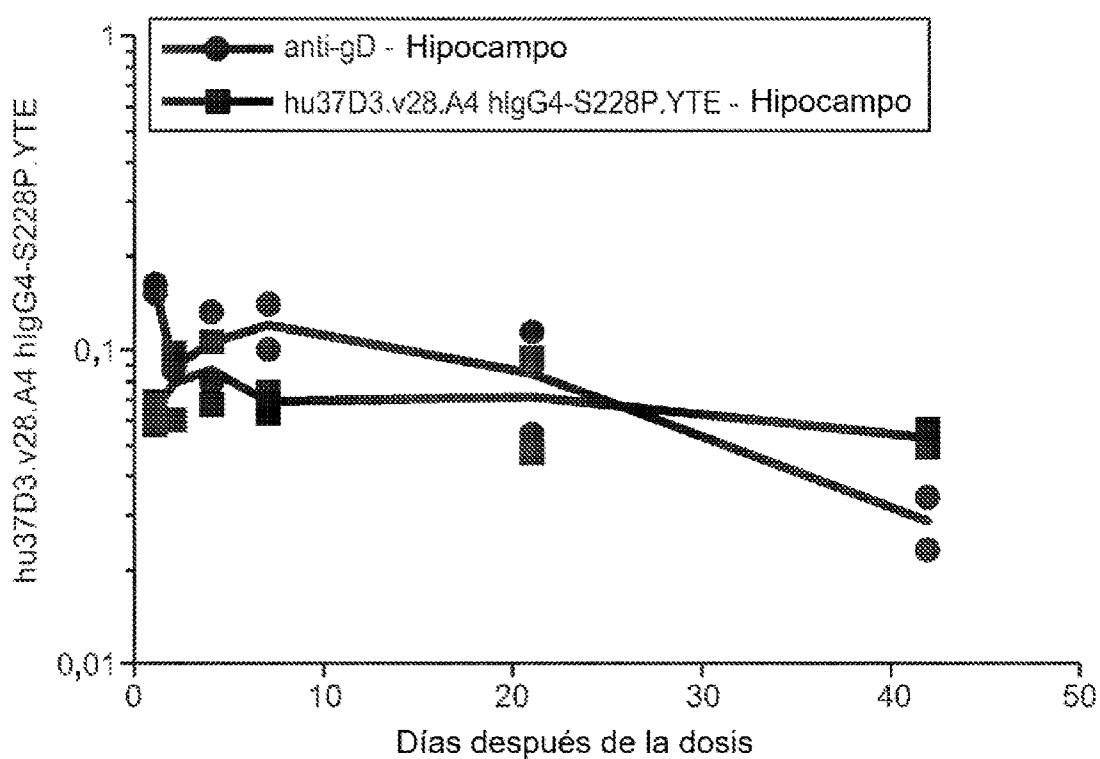
FIG. 21D



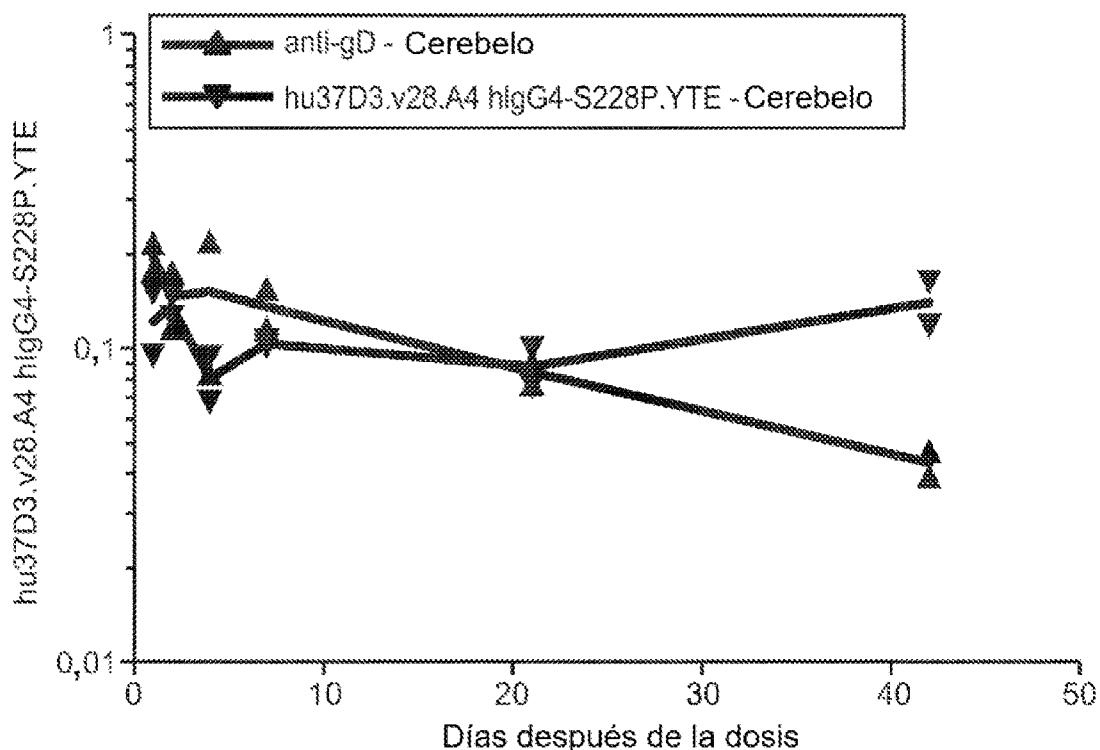
**FIG. 22A**



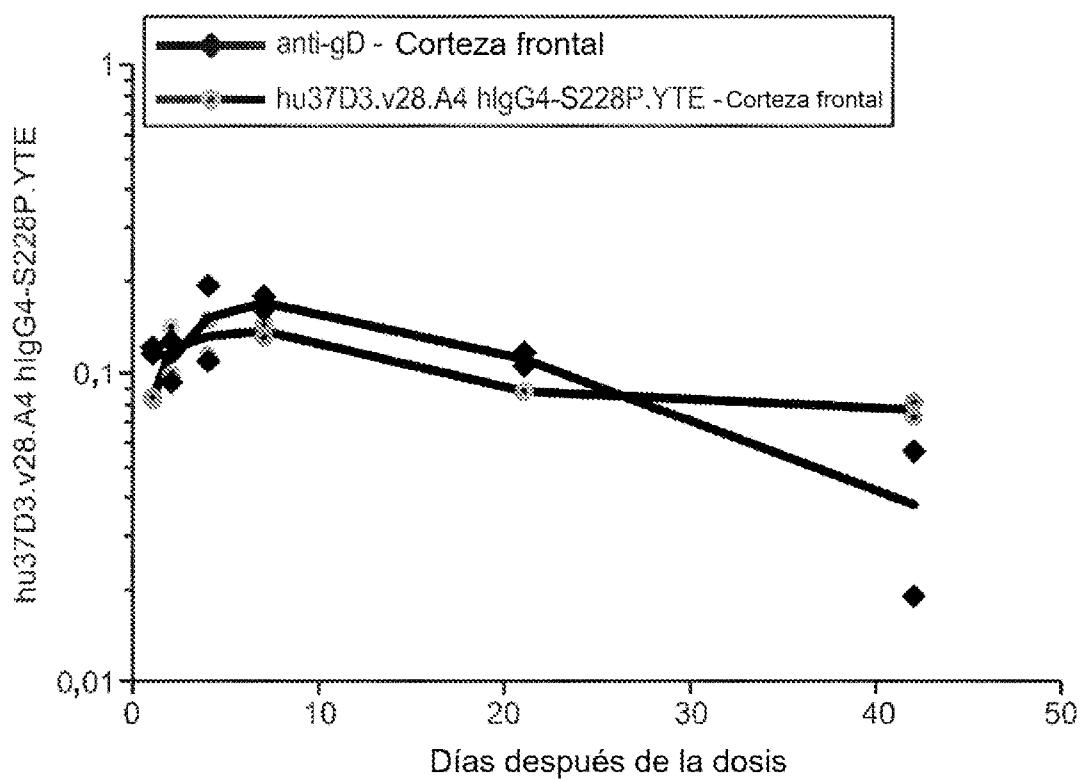
**FIG. 22B**



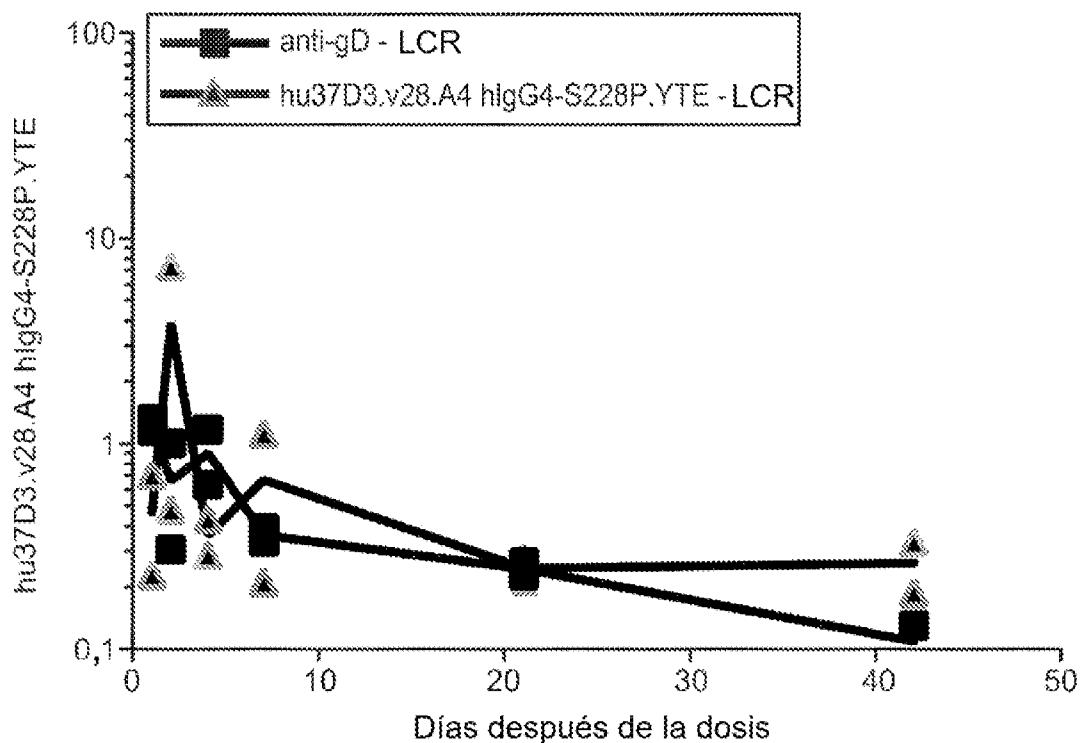
**FIG. 23A**



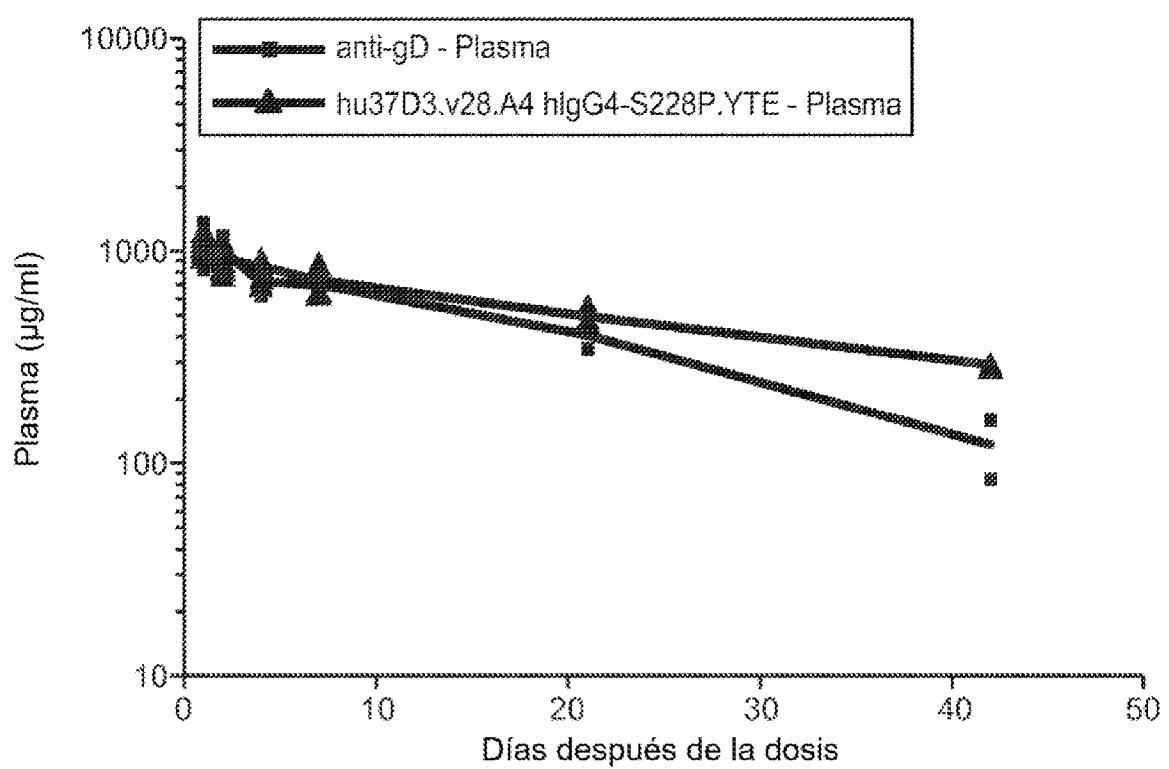
**FIG. 23B**



**FIG. 23C**



**FIG. 23D**



**FIG. 23E**

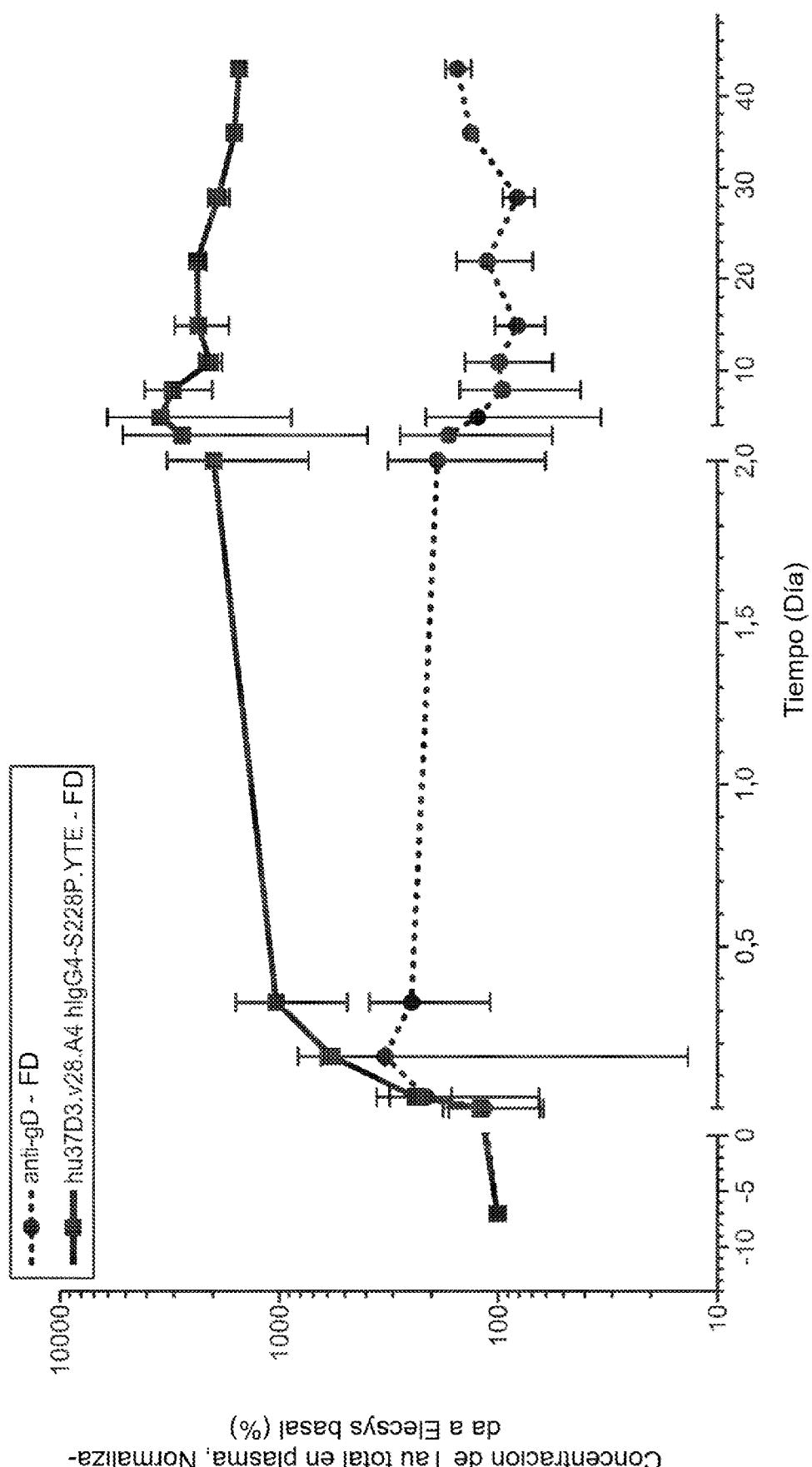


FIG. 24A

