

1

ANTICUERPOS QUE RECONOCEN TAU

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Estadounidense No. 62/758,421 presentada el 9 de noviembre de 2018 y la solicitud PCT No. PCT/US2018/059895 presentada el 8 de noviembre de 2018, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[002] Esta solicitud incluye un listado de secuencias electrónicas en un archivo denominado 2019-11-08 536322WO_ST25.TXT, creado el 8 de noviembre de 2019 y que contiene 96,408 bytes, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[003] Tau es una proteína humana bien conocida que puede existir en formas fosforiladas (ver, por ejemplo, Goedert, *Proc. Natl Acad Sci.* EUA 85: 4051-4055 (1988); Goedert, *EMBO J.* 8: 393 399 (1989); Lee, *Neuron* 2: 1615-1624 (1989); Goedert, *Neuron* 3: 519-526 (1989); Andreadis, *Biochemistry* 31: 10626-10633 (1992). Se ha informado que Tau tiene un papel en la estabilización de los microtúbulos, particularmente en el sistema nervioso central. El cerebro libera tau total (t-tau, es decir, formas fosforiladas y no fosforiladas) y fosfo-tau (p-tau, es decir, fosforiladas) en respuesta a lesiones neuronales y neurodegeneración y se ha informado que ocurren a niveles elevados en el LCR de los pacientes de Alzheimer en relación con la población general (Jack et al., *Lancet Neurol* 9: 119-28 (2010)).

[004] La tau es el constituyente principal de los enredos neurofibrilares, que junto con las placas son una característica distintiva de la enfermedad de Alzheimer. Los enredos constituyen fibrillas anormales que miden 10 nm de diámetro y se producen en pares enrollados de forma helicoidal con una periodicidad regular de 80 nm. La tau dentro de los enredos neurofibrilares está anormalmente fosforilada (hiperfosforilada) con grupos de fosfato unidos a sitios específicos en la molécula. En las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, el CA1 y las regiones subiculares del hipocampo, la amígdala y las capas más

profundas (capas III, V y superficial VI), se observa una afectación grave de los enredos neurofibrilares del neocórtex en la enfermedad de Alzheimer. También se ha informado que la tau hiperfosforilada interfiere con el ensamblaje de los microtúbulos, lo que puede promover la ruptura de la red neuronal.

- 5 [005] Las inclusiones de Tau son parte de la neurofisiología definitoria de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la degeneración lobar frontotemporal, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Pick.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION REIVINDICADA**

- [006] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la tau humana, que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las CDR H1, H2 y H3 que comprenden las SEQ ID NOS: 8, 9 y 10, respectivamente, excepto que la posición H28 puede estar ocupada por N o T, H54 puede estar ocupada por N o D, H56 puede estar ocupada por D o E, y la posición H58 puede estar ocupada por V o I, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las CDR L1, L2 y L3 que comprenden SEQ ID NOS: 12, 13 y 14 respectivamente, excepto que la posición L24 puede estar ocupada por K o R, donde al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por Q, H5 está ocupada por Q, H11 está ocupada por L, H20 está ocupada por L, H23 está ocupada por T, H38 está ocupada por K, H75 está ocupada por S, H56 está ocupada por E, H58 está ocupada por I, L10 está ocupada por T, L17 está ocupada por E, L24 está ocupada por R, L37 está ocupada por Q, L83 está ocupada por L, L86 está ocupada por H, L100 está ocupada por A o Q, está ocupada por L.

- 25 [007] En algunos de dichos anticuerpos, CDR-H1 comprende SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 92, CDR-H3 comprende SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 89, CDR-L2 comprende SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende SEQ ID NO: 14. En algunos de estos anticuerpos, CDR-H1 comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 88, CDR-H3 comprende la SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 89, CDR-L2 comprende la

SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende la SEQ ID NO: 14. En algunos de estos anticuerpos, CDR-H1 comprende la SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende la SEQ ID NO: 92, CDR-H3 comprende la SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 89, CDR-L2 comprende la SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende la SEQ ID NO: 14.

5 [008] En algunos de tales anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86. En algunos de tales anticuerpos, CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87. En algunos de tales anticuerpos, CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 88. En algunos de tales anticuerpos, CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que
10 comprende la SEQ ID NO: 92. En algunos de dichos anticuerpos, CDR-L1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89.

[009] En algunos de tales anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87. En algunos de tales anticuerpos, CDR-H1 tiene una
15 secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 88. En algunos de tales anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 92.

[010] En algunos de tales anticuerpos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un
20 anticuerpo revestido o un anticuerpo quimérico.

[011] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a cualquiera de las
25 SEQ ID NO: 76-80 y SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura humanizada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a
30 cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y la región variable de cadena ligera madura humanizada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura humanizada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a
cualquiera de las SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura

humanizada tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

[012] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H93 está ocupada por S y H94 está ocupada por T. En algunos de estos anticuerpos, las posiciones H93 y H94 están ocupadas por S y T, respectivamente.

[013] En algunos de estos anticuerpos, la posición H91 en la región VH está ocupada por F.

[014] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por E, H5 está ocupada por V, H11 está ocupada por V, H20 está ocupada por I, H23 está ocupada por K, H38 está ocupada por R, H42 está ocupada por G, H43 está ocupada por K, H66 está ocupada por R, H75 está ocupada por T, H76 está ocupada por D, H81 está ocupada por E, H108 está ocupada por L, H109 está ocupada por V. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L y V, respectivamente.

[015] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H17 está ocupada por T, H80 está ocupada por M, H83 está ocupada por R. En algunos anticuerpos, las posiciones H17, H80 y H83 en la región VH están ocupadas por T, M y R, respectivamente.

[016] En algunos de estos anticuerpos, la posición H58 en la región VH está ocupada por I.

[017] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido como se especifica: H28 está ocupada por T, H67 está ocupada por V. En algunos anticuerpos, las posiciones H28 y H67 en la región VH están ocupadas por T y V, respectivamente.

[018] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H54 está ocupada por D, H56 está ocupada por E. En algunos anticuerpos, las posiciones H54 y H56 en la región VH están ocupadas por D y E, respectivamente.

5

[019] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por Q o E, H5 está ocupada por Q o V, H11 está ocupada por L o V, H17 está ocupada por S o T, H20 está ocupada por L o I, H23 está ocupada por T o K, H28 está ocupada por N o T, H38 está ocupada por K o R, H42 está ocupada por E o G, H43 está ocupada por Q o K, H54 está ocupada por N o D, H56 está ocupada por D o E, H58 está ocupada por V o I, H66 está ocupada por K o R, H67 está ocupada por A o V, H75 está ocupada ocupado por S o T, H76 está ocupada por N o D, H80 está ocupada por L o M, H81 está ocupada por Q o E, H83 está ocupada por T o R, H91 está ocupada por F o Y, H93 está ocupada por S, H94 está ocupada por T, H108 está ocupada por T o L, H109 está ocupada por L o V.

[020] En algunos anticuerpos, las posiciones H91, H93 y H94 en la región VH están ocupadas por F, S y T, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H91, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L y V, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, R, G, K, I, R, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, F, S, T, L y V, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente.

[021] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 está ocupada por S, L10 está ocupada por S, L15 está ocupada por L, L83 está ocupada por V, L86 está ocupada por Y y L106 está ocupada por I. En algunos anticuerpos, las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 están ocupadas por S, S, L, V, Y e Y, respectivamente.

[022] En algunos de estos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 es T o S, L10 es T o S, L15 es I o L, L17 es Q o E, L24 es K o R, L37 es L o Q, L45 es K o R, L83 es L o V, L86 es H o Y, L100 es A o Q, L106 es L o I.

[023] En algunos anticuerpos, las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 en la región VL están ocupadas por S, S, L, V, Y e I, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100 y L106 en la región VL están ocupadas por S, S, L, E, R, Q, R, V, Y, Q e I, respectivamente.

[024] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

[025] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

[030] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

[031] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

[032] Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo revestido.

[033] El anticuerpo puede ser un ratón intacto, un anticuerpo quimérico, revestido o humanizado o un fragmento de unión, un fragmento Fab de cadena simple, un fragmento Fab'2 o un Fv de cadena simple. Algunos de los anticuerpos tienen un isotipo IgG1 humano, mientras que otros pueden tener un isotipo IgG2 o IgG4 humano. Algunos anticuerpos tienen la región variable de cadena ligera madura fusionada a una región constante de cadena ligera y la región variable de cadena pesada madura fusionada a una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada de algunos anticuerpos es una forma mutante de una región constante de la cadena pesada humana natural que ha reducido la unión a un receptor Fcγ en relación con la región constante de cadena pesada humana natural. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID

NO:103 con o sin la lisina C-terminal y/o la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104.

[034] Algunos anticuerpos pueden tener al menos una mutación en la región constante, como una mutación que reduce la fijación o activación del complemento por la región constante, por ejemplo, una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 y 331 por numeración de la UE. Algunos anticuerpos tienen una alanina en las posiciones 318, 320 y 322. Algunos anticuerpos pueden ser al menos 95% p/p puros. El anticuerpo puede conjugarse con un agente terapéutico, citotóxico, citostático, neurotrófico o neuroprotector.

[035] En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[036] En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico y una célula huésped transformada con el vector de expresión recombinante. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 30-31, 93-99, 100-102 y 105-106. En otro ejemplo, el ácido nucleico puede tener una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 30-31, 93-97, 100-102 y 105-106. En otro ejemplo, el ácido nucleico puede tener una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 30-31, 98-99, 100-102 y 105-106.

[037] En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura vinculada operativamente a una o más secuencias reguladoras para efectuar la expresión en una célula de mamífero de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, una célula huésped que comprende el ácido nucleico y un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprende incorporar el ácido nucleico en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

[038] Algunos vectores comprenden un ácido nucleico que además codifica una región constante de cadena pesada fusionada a la región variable de cadena pesada madura y

una región constante de cadena ligera fusionada a la región variable de cadena ligera madura. En algunos vectores, la región constante de cadena pesada codificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 103 con o sin la lisina C-terminal y la región constante de cadena ligera codificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104. En algunos vectores, la región constante de la cadena pesada está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 105 y la región constante de cadena ligera está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 106.

[039] En algunos vectores, el anticuerpo expresado codificado por el ácido nucleico es un scFv. En algunos vectores, el anticuerpo expresado codificado por el ácido nucleico es un fragmento Fab.

[040] En algunos vectores, las una o más secuencias reguladoras incluyen una o más de un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma y señal de terminación de la transcripción. En algunos vectores, el ácido nucleico codifica además péptidos señal fusionados con las regiones variables maduras de cadena pesada y ligera. En algunos vectores, el ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión en una célula huésped. En algunos vectores, las una o más secuencias reguladoras incluyen un promotor eucariota. En algunos vectores, el ácido nucleico codifica además un gen seleccionable.

[041] En otro aspecto, la invención proporciona primero y segundo vectores que comprenden respectivamente ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura, cada uno vinculado operativamente a una o más secuencias reguladoras para efectuar la expresión en una célula de mamífero de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, una célula huésped que comprende los ácidos nucleicos y un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprende incorporar los ácidos nucleicos en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

[042] En algunos vectores, los ácidos nucleicos codifican además respectivamente una región constante de cadena pesada fusionada con la región variable de cadena pesada madura y una región constante de cadena ligera fusionada con la región variable de cadena ligera madura. En algunos vectores, la región constante de cadena pesada codificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 103 con o sin la lisina C-terminal y la región constante de cadena ligera codificada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104. En algunos vectores, la

región constante de cadena pesada está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 105 y la región constante de cadena ligera está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 106.

[043] En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para humanizar cualquier anticuerpo no humano descrito en el presente documento, por ejemplo, el anticuerpo 3D6 de ratón, en el que 3D6 se caracteriza por una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 11. Dichos métodos pueden involucrar la selección de uno o más anticuerpos aceptores, sintetizar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende CDR de la cadena pesada de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera humanizada que comprende CDR de la cadena ligera de anticuerpo de ratón y expresar los ácidos nucleicos En una célula huésped para producir un anticuerpo humanizado.

[044] También se proporcionan métodos para producir anticuerpos, tales como un anticuerpo humanizado, quimérico o revestido, por ejemplo, formas humanizadas, quiméricas o revestidas de 3D6. En tales métodos, las células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se cultivan de modo que las células secreten el anticuerpo. El anticuerpo puede entonces purificarse a partir del medio de cultivo celular.

[045] Las líneas celulares que producen cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden producir mediante la introducción de un vector que codifica cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y un marcador seleccionable en las células, propagando las células bajo condiciones para seleccionar las células que tengan un mayor número de copias del vector, aislando células individuales de las CÉLULAS seleccionadas; y células bancarias clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento del anticuerpo.

[046] Algunas células pueden propagarse en condiciones selectivas y rastrear las líneas celulares que expresan naturalmente y secretan el anticuerpo en una cantidad de al menos 100 mg/L/10⁶ células/24 horas. Se pueden aislar células individuales de las células seleccionadas. Las células clonadas a partir de una sola célula pueden entonces almacenarse. Se pueden seleccionar células individuales en función de las propiedades deseables, como el rendimiento del anticuerpo. Las líneas celulares ejemplares son líneas celulares que expresan 3D6.

[047] La invención también proporciona métodos para inhibir o reducir la agregación de tau en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por tau, que comprende administrar al sujeto un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento, inhibiendo o reduciendo así la agregación de tau en el sujeto. Los anticuerpos
5 ejemplares incluyen versiones humanizadas de 3D6.

[048] También se proporcionan métodos para tratar o realizar la profilaxis de una enfermedad relacionada con tau en un sujeto, que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento y, por lo tanto, tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad. Ejemplos de tales enfermedades son la enfermedad de
10 Alzheimer, el síndrome de Down, el deterioro cognitivo leve, la tauopatía primaria relacionada con la edad, el parkinsonismo postencefálico, la demencia postraumática o la demencia pugilística, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, la parálisis supranuclear, la demencia frontotemporal, la degeneración frontotemporal lobar, grano argirofílico, tauopatía glial globular, esclerosis lateral amiotrófica/complejo de
15 demencia de parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CDB), demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP). En algunos métodos, la enfermedad relacionada con la tau es la enfermedad de Alzheimer. En algunos métodos, el paciente es portador de ApoE4.

[049] También se proporcionan métodos para reducir la transmisión aberrante de tau que comprenden administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento y reducir así la transmisión de tau.

[050] También se proporcionan métodos para inducir la fagocitosis de tau que comprenden administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento y de ese
25 modo inducir la fagocitosis de tau.

[051] También se proporcionan métodos para inhibir la agregación o deposición de tau que comprenden administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento inhibiendo de ese modo la agregación o deposición de tau.

[052] También se proporcionan métodos para inhibir la formación de ovillos de tau que
30 comprenden administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento.

[053] La invención también proporciona un método para detectar depósitos de proteína tau en un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad asociada con la agregación o deposición de tau que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo descrito en este documento y detectar el anticuerpo unido a tau en el sujeto. Ejemplos de una enfermedad de este tipo son la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, el deterioro cognitivo leve, la tauopatía primaria relacionada con la edad, el parkinsonismo postencefalítico, la demencia postraumática o la demencia pugilística, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, la parálisis supranuclear, la demencia frontotemporal, la degeneración frontotemporal lobar, grano argirofílico, tauopatía glial globular, esclerosis lateral amiotrófica/complejo de demencia de parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CDB), demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP). En algunas modalidades, el anticuerpo se administra directamente al cerebro del sujeto mediante inyección intracraneal o perforando un agujero a través del cráneo del sujeto. En algunas modalidades, el anticuerpo está marcado. En algunas modalidades, el anticuerpo está marcado con una etiqueta fluorescente, una etiqueta paramagnética o una etiqueta radioactiva. En algunas modalidades, la etiqueta radioactiva se detecta mediante tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[054] La invención también proporciona un método para medir la eficacia del tratamiento en un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad asociada con la agregación o deposición de tau, que comprende medir un primer nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto antes del tratamiento administrando a un sujeto un anticuerpo descrito en este documento, y detectando una primera cantidad del anticuerpo unido a tau en el sujeto, administrando el tratamiento al sujeto, midiendo un segundo nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto después del tratamiento administrando a un sujeto el anticuerpo, y detectar el anticuerpo unido a tau en el sujeto, en donde una disminución en el nivel de depósitos de proteína tau indica una respuesta positiva al tratamiento.

[055] La invención también proporciona un método para medir la eficacia del tratamiento en un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad asociada con la agregación o

deposición de tau, que comprende medir un primer nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto antes del tratamiento administrando a un sujeto un anticuerpo descrito en este documento, y detectar una primera cantidad de anticuerpo unido a tau en el sujeto, administrar el tratamiento al sujeto, medir un segundo nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto después del tratamiento administrando a un sujeto el anticuerpo y detectar una segunda cantidad de anticuerpo unido a tau en el sujeto, en donde ningún cambio en el nivel de depósitos de proteína tau o un pequeño aumento en los depósitos de proteína tau indica una respuesta positiva al tratamiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[056] La Figura 1 representa una alineación de regiones variables de cadena pesada del anticuerpo 3D6 de ratón (SEQ ID NO: 7) y versiones humanizadas del anticuerpo 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6, y hu3D6VHvb7) con secuencia de región variable de cadena pesada de la línea germinal humana IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) y con la secuencia de región variable de cadena pesada del aceptor humano 2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO: 75). hu3D6VHvb1 es la SEQ ID NO: 76, hu3D6VHvb2 es la SEQ ID NO: 77, hu3D6VHvb3 es la SEQ ID NO: 78, hu3D6VHvb4 es la SEQ ID NO: 79, hu3D6VHvb5 es la SEQ ID NO: 80, hu3D6VHvb6 es la SEQ ID NO: 90, hu3D6VHvb7 es la SEQ ID NO: 91. Los CDR definidos por el compuesto de Kabat/Chothia están en negrita.

[057] La Figura 2 representa una alineación de las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo 3D6 de ratón (SEQ ID NO: 11) y versiones humanizadas del anticuerpo 3D6 (hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3) con la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV2- 30 * 02 (SEQ ID NO: 27) y con el aceptor humano ARX71335_VL_hFrwk (SEQ ID NO: 82). hu3D6VLvb1 es la SEQ ID NO: 83, hu3D6VLvb2 es la SEQ ID NO: 84 y hu3D6VLvb3 es la SEQ ID NO: 85. Los CDR definidos por Kabat están en negrita.

[058] Las Figuras 3A, 3B y 3C representan los resultados de los ensayos de selección ELISA para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

[059] La Figura 4 representa la cinética de unión para anticuerpos anti-tau monoclonales de ratón seleccionados para tau humana recombinante.

[060] La Figura 5 muestra los resultados de los ensayos de bloqueo funcional para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

[061] La Figura 6 representa los resultados de los ensayos de desagregación para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

5 [062] La Figura 7 muestra los resultados de experimentos que muestran el tau de inmunocaptura 3D6 y 5G8 del tejido de la enfermedad de Alzheimer humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

10 [063] SEQ ID NO:1 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-8).

[064] SEQ ID NO:2 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-7).

[065] SEQ ID NO:3 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-6), (4R0N human tau).

15 [066] SEQ ID NO:4 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-5)

[067] SEQ ID NO:5 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-4).

20 [068] SEQ ID NO:6 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-2).

[069] SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 de ratón.

[070] SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat/Chothia composite CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

25 [071] SEQ ID NO:9 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[072] SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

30 [073] SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

[074] SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L1 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

[075] SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L2 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

5 [076] SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L3 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

[077] SEQ ID NO:15 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1.

10 [078] SEQ ID NO:16 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv2.

[079] SEQ ID NO:17 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1b.

[080] SEQ ID NO:18 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11.

15 [081] SEQ ID NO:19 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv5:

[082] SEQ ID NO:20 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv1.

20 [083] SEQ ID NO:21 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv2.

[084] SEQ ID NO:22 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv3.

[085] SEQ ID NO:23 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv4.

25 [086] SEQ ID NO:24 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. BAC01986.1.

[087] SEQ ID NO:25 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGHV1-69-2*01.

30 [088] SEQ ID NO:26 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGKJ1*01.

[089] SEQ ID NO:27 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKV2-30*02

[090] SEQ ID NO:28 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKJ2*01.

5 [091] SEQ ID NO:29 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. AAZ09048.1.

[092] SEQ ID NO: 30 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 de ratón.

10 [093] SEQ ID NO: 31 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 de ratón.

[094] SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[095] SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de aminoácidos de Chothia CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

15 [096] SEQ ID NO: 34 establece la secuencia de aminoácidos de Chothia CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[097] SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de aminoácidos de AbM CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

20 [098] SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[099] SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[0100] SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

25 [0101] SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[0102] SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

30 [0103] SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-H3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[0104] SEQ ID NO: 42 establece la secuencia de aminoácidos de un Compuesto de Kabat-Chothia alterno CDR-H1 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1e, y hu3D6VHv1f).

[0105] SEQ ID NO: 43 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (derivado de hu3D6VHv5 y hu3D6VHv1bA11B6H3).

[0106] SEQ ID NO:44 establece la secuencia de aminoácidos de consenso entre las regiones variables de cadena pesada del 3D6 de ratón y los anticuerpos 3D6 humanizados seleccionados (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11, y VHv5) (marcados "Mayoría" en la Figura 2 de PCT/IB2017/052544).

[0107] SEQ ID NO:45 establece la secuencia de aminoácidos de consenso between las regiones variables de cadena ligera del 3D6 de ratón y anticuerpos 3D6 humanizados seleccionados (marcados "Mayoría" en la Figura 3 de PCT/IB2017/052544).

[0108] SEQ ID NO:46 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11B6G2.

[0109] SEQ ID NO:47 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11B6H3.

[0110] SEQ ID NO:48 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1c.

[0111] SEQ ID NO:49 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1d.

[0112] SEQ ID NO:50 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1e.

[0113] SEQ ID NO:51 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1f.

[0114] SEQ ID NO:52 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3.

[0115] SEQ ID NO:53 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3b.

[0116] SEQ ID NO:54 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3c.

[0117] SEQ ID NO:55 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4.

[0118] SEQ ID NO:56 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4b.

5 [0119] SEQ ID NO:57 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4c.

[0120] SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácidos de un Compuesto de Kabat-Chothia alterno CDR-H1 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VH1c).

10 [0121] SEQ ID NO: 59 establece la secuencia de aminoácidos de un Compuesto de Kabat-Chothia alterno CDR-H1 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

[0122] SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de aminoácidos de un Compuesto de Kabat-Chothia alterno CDR-H1 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv3b y hu3D6VHv4b).

15 [0123] SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1bA11B6G2).

[0124] SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, y hu3D6VHv4b).

20 [0125] SEQ ID NO: 63 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

[0126] SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1e).

25 [0127] SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H3 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1f).

[0128] SEQ ID NO:66 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6A10 de ratón.

30 [0129] SEQ ID NO: 67 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat/Chothia composite CDR-H1 del anticuerpo 6A10 de ratón.

[0130] SEQ ID NO:68 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del anticuerpo 6A10 de ratón.

[0131] SEQ ID NO: 69 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo 6A10 de ratón.

5 [0132] SEQ ID NO:70 establece la secuencia de aminoácidos de la región VH de anticuerpo de ratón (código pdb 1CR9) usada como una plantilla de estructura para la humanización de cadena pesada.

[0133] SEQ ID NO:71 establece la secuencia de aminoácidos de consenso entre las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos 3D6 humanizados seleccionados
10 (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, y VHv5) (marcados "Mayoría" en la Figuras 4A y 4B de PCT/IB2017/052544).

[0134] SEQ ID NO: 72 establece la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo 3D6 quimérico.

15 [0135] SEQ ID NO: 73 establece la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo 3D6 quimérico.

[0136] SEQ ID NO:74 establece la secuencia de aminoácidos del modelo estructural variable de cadena pesada Acc.No. 5MYX-VH_mSt.

[0137] SEQ ID NO:75 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de
20 cadena pesada Acc.No. 2RCS-VH_huFrwk.

[0138] SEQ ID NO:76 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1.

[0139] SEQ ID NO:77 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2.

25 [0140] SEQ ID NO:78 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3.

[0141] SEQ ID NO:79 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4.

[0142] SEQ ID NO:80 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de
30 cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5.

[0143] SEQ ID NO:81 establece la secuencia de aminoácidos del modelo estructural variable de cadena ligera Acc.No. 5MYX-VL_mSt.

[0144] SEQ ID NO:82 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc.No. ARX71335-VL_huFrwk.

5 [0145] SEQ ID NO:83 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1.

[0146] SEQ ID NO:84 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2.

10 [0147] SEQ ID NO:85 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3.

[0148] SEQ ID NO:86 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H1 de Compuesto de Kabat-Chothia alternativo de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb4 y hu3D6VHvb5).

15 [0149] SEQ ID NO:87 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alternativo de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb3 y hu3D6VHvb4).

[0150] SEQ ID NO:88 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alternativo de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb5).

[0151] SEQ ID NO:89 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L1 de Kabat alternativo de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VLvb3).

20 [0152] SEQ ID NO:90 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6.

[0153] SEQ ID NO:91 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7.

25 [0154] SEQ ID NO:92 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alternativo de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7).

[0155] SEQ ID NO:93 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1.

[0156] SEQ ID NO:94 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2.

30 [0157] SEQ ID NO:95 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3.

[0158] SEQ ID NO:96 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4.

[0159] SEQ ID NO:97 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5.

5 [0160] SEQ ID NO:98 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6.

[0161] SEQ ID NO:99 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7.

10 [0162] SEQ ID NO:100 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1.

[0163] SEQ ID NO:101 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2.

[0164] SEQ ID NO:102 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3.

15 [0165] SEQ ID NO:103 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de IgG1 ejemplar.

[0166] SEQ ID NO:104 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa ejemplar.

20 [0167] SEQ ID NO:105 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de IgG1 ejemplar.

[0168] SEQ ID NO:106 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena ligera kappa ejemplar.

DEFINICIONES

25 [0169] Los anticuerpos monoclonales u otras entidades biológicas se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo u otra entidad biológica es típicamente al menos el 50% p/p de proteínas interferentes y otros contaminantes que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de vehículo farmacéuticamente aceptable(s) u otro

30 vehículo destinado a facilitar su uso. A veces, los anticuerpos monoclonales son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en peso de proteínas interferentes y contaminantes de

la producción o purificación. A menudo, un anticuerpo monoclonal aislado u otra entidad biológica es la especie macromolecular predominante que permanece después de su purificación.

[0170] La unión específica de un anticuerpo a su antígeno objetivo significa una afinidad y/o
5 avidez de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} M⁻¹. La unión específica es detectable de mayor magnitud y se distingue de la unión no específica que se produce en al menos un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales particulares o un ajuste espacial particular (por ejemplo, tipo de cerradura y llave), mientras que la unión no específica suele ser el resultado de las
10 fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no necesariamente implica que un anticuerpo se una a un solo objetivo.

[0171] La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa).

15 La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Esta región variable se expresa inicialmente vinculada a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina a veces región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable madura de cadena ligera significa una región
20 variable de cadena ligera sin el péptido señal de cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

[0172] Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como
25 IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región “D” de aproximadamente 10 o más aminoácidos. *Ver en general, Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y., 1989, cap. 7 (incorporado por referencia en su totalidad a todos los
30 efectos).

[0173] Una región variable de cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina (también denominada aquí “dominio variable de cadena ligera” (“dominio VL”) o “dominio variable de cadena pesada” (“dominio VH”), respectivamente) consiste en una región “marco” interrumpida por tres “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR”. Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Las CDR incluyen los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son los principales responsables de la unión al antígeno. Desde el término amino hasta el término carboxilo, los dominios VL y VH comprenden las siguientes regiones marco (FR) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VL también se denominan en el presente documento, respectivamente, como CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VH también se denominan en el presente documento, respectivamente, como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Cuando la solicitud divulga una secuencia VL con R como el residuo C-terminal, la R puede considerarse alternativamente como que es el residuo N-terminal de la región constante de cadena ligera. Por lo tanto, la solicitud deberá también entenderse como que divulga la secuencia VL sin la R de C-terminal.

[0174] La asignación de aminoácidos a cada dominio VL y VH está de acuerdo con cualquier definición convencional de CDR. Las definiciones convencionales incluyen, la definición de Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), la definición de Chothia (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342: 878-883, 1989); un compuesto de CDR Chothia Kabat en el que CDR-H1 es un compuesto de CDR Chothia y Kabat; la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos de Oxford Molecular; y, la definición de Contacto de Martin et al (bioinfo.org.uk/abs) (ver Tabla 1). Kabat proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número. Cuando se dice que un anticuerpo comprende CDR por una cierta definición de CDR (por ejemplo, Kabat), esa definición especifica el número mínimo de residuos de CDR presentes en el anticuerpo (es decir, las CDR de Kabat). No excluye que otros residuos que se encuentren dentro de otra definición de CDR convencional pero que estén fuera de la definición especificada también estén presentes.

Por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR definidas por Kabat incluye entre otras posibilidades, un anticuerpo en el que las CDR contienen residuos de la CDR de Kabat y ningún otro residuo de la CDR, y un anticuerpo en el que la CDR-H1 es una CDR-H1 compuesta de Chothia-Kabat y otras CDR que contienen residuos de CDR de Kabat y ningún residuo de CDR adicional basado en otras definiciones.

Tabla 1

Definiciones Convencionales de CDR Que Utilizan el Compuesto de Numeración

Bucle	Kabat	Chothia	Compuesto de Chotihia y Kabat	AbM	Contacto
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

* CDR-H1 por Chothia puede terminar en H32, H33 o H34 (dependiendo de la longitud del bucle). Esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca inserciones de residuos extra en 35A y 35B, mientras que la numeración de Chlothia las coloca en 31A y 31B. Si ninguno de H35A o H35B (numeración de Kabat) está presente, el bucle de Chothia CDR-H1 termina en H32. Si sólo H35A está presente, termina en H33. Si

tanto H35A como H35B están presentes, termina en H34.

[0175] El término “anticuerpo” incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del cual se derivaron para la unión específica al objetivo, incluidas cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_C, Dabs, nanocuerpos, y Fv. Los fragmentos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término “anticuerpo” también incluye un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes (véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148: 1547-53 (1992)). En algunos anticuerpos biespecíficos, los dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes incluyen un par de cadena pesada/cadena ligera 3D6 humanizado y un par de cadena ligera/cadena pesada específico para un epítipo diferente en tau que el unido por 3D6.

[0176] En algunos anticuerpos biespecíficos, un par de cadena pesada/cadena ligera es un anticuerpo 3D6 humanizado como se describe más adelante y el otro par de cadena pesada/cadena ligera es de un anticuerpo que se une a un receptor expresado en la barrera hematoencefálica, como una insulina. receptor, un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), un receptor de leptina o un receptor de lipoproteínas, o un receptor de transferrina (Friden et al., *Proc. Natl Acad Sci. EUA* 88: 4771-4775, 1991; Friden et al., *Science* 259: 373-377, 1993). Dicho anticuerpo biespecífico puede transferirse a través de la barrera hematoencefálica por medio de la transcitosi mediada por receptor. La captación cerebral del anticuerpo biespecífico puede mejorarse aún más mediante la ingeniería del anticuerpo biespecífico para reducir su afinidad al receptor de la barrera hematoencefálica. La afinidad reducida por el receptor dio lugar a una distribución más amplia en el cerebro (ver, por ejemplo, Atwal et al., *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu et al., *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

[0177] Los anticuerpos biespecíficos ejemplares también pueden ser: (1) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), en donde cada cadena ligera y pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, En: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)) (2) un Tandab, que es una fusión

de dos diacuerpos monocatenarios que dan como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (3) un flexocuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que resulta en una molécula multivalente; (4) la llamada molécula “*dock and lock*”, basada en el “dominio de dimerización y acoplamiento” en la Proteína quinasa A, que cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; o (5) una llamada molécula de Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de una región Fc humana. Entre los ejemplos de plataformas útiles para preparar anticuerpos biespecíficos se incluyen BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab2 (F-star), IgGI (Xencor) diseñada por Fc o DuoBody (basada en intercambio de rama Fab, Genmab).

[0178] El término “epítopo” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo puede formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos (también conocidos como epítopos lineales) se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítopos conformacionales) se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, Protocolos de mapeo de epítopos, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

[0179] Los anticuerpos que reconocen los mismos epítopos o los superpuestos pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo. El epítopo de un anticuerpo también se puede definir en la cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítopo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos

superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[0180] La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo en prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (ver, por ejemplo, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Un anticuerpo de prueba compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos el 50% según lo medido en un ensayo de unión competitiva. Algunos anticuerpos de prueba inhiben la unión del anticuerpo de referencia en al menos 75%, 90% o 99%. Los anticuerpos identificados por ensayos de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítopo adyacente suficientemente proximal al epítopo unido por el anticuerpo de referencia para el impedimento estérico que se produzca.

[0181] El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el vehículo, diluyente, excipiente o auxiliar es compatible con los otros ingredientes de la formulación y no es sustancialmente perjudicial para el receptor de la misma.

[0182] El término “paciente” incluye humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

[0183] Un individuo tiene un riesgo mayor de contraer una enfermedad si el sujeto tiene al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, genética, bioquímica, antecedentes familiares y exposición situacional), lo que coloca a los individuos con ese factor de riesgo en un riesgo estadísticamente significativo mayor de desarrollar la enfermedad que los individuos sin el factor de riesgo.

[0184] El término “muestra biológica” se refiere a una muestra de material biológico dentro o que puede obtenerse de una fuente biológica, por ejemplo, un sujeto humano o mamífero. Dichas muestras pueden ser órganos, orgánulos, tejidos, secciones de tejidos, fluidos corporales, sangre periférica, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, células, moléculas tales como proteínas y péptidos, y cualquier parte o combinación derivada de ellos. El término muestra biológica también puede abarcar cualquier material derivado del procesamiento de la muestra. El material derivado puede incluir células o su progenie. El procesamiento de la

muestra biológica puede implicar uno o más de filtración, destilación, extracción, concentración, fijación, inactivación de componentes interferentes y similares.

[0185] El término “muestra de control” se refiere a una muestra biológica que no se sabe o se sospecha que incluye regiones afectadas por la enfermedad relacionada con la tau, o al menos no se sabe o se sospecha que incluye regiones enfermas de un tipo determinado. Las muestras de control se pueden obtener de individuos que no padecen la enfermedad relacionada con tau. Alternativamente, se pueden obtener muestras de control de pacientes afectados con la enfermedad relacionada con tau. Dichas muestras se pueden obtener al mismo tiempo que una muestra biológica que se cree que comprende la enfermedad relacionada con tau o en una ocasión diferente. Una muestra biológica y una muestra de control pueden obtenerse del mismo tejido. Preferiblemente, las muestras de control consisten esencialmente o completamente en regiones sanas y normales y pueden usarse en comparación con una muestra biológica que se cree que comprende regiones afectadas por la enfermedad relacionada con la tau. Preferiblemente, el tejido en la muestra de control es del mismo tipo que el tejido en la muestra biológica. Preferiblemente, las células afectadas por la enfermedad que se cree que se encuentran en la muestra biológica provienen del mismo tipo de célula (por ejemplo, neuronas o glía) que el tipo de células en la muestra de control.

[0186] El término “enfermedad” se refiere a cualquier condición anormal que perjudica la función fisiológica. El término se usa ampliamente para abarcar cualquier trastorno, enfermedad, anormalidad, patología, enfermedad, afección o síndrome en el que la función fisiológica está alterada, independientemente de la naturaleza de la etiología.

[0187] El término “síntoma” se refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, como la marcha alterada, según lo percibe el sujeto. Un “signo” se refiere a la evidencia objetiva de una enfermedad observada por un médico.

[0188] El término “respuesta positiva al tratamiento” se refiere a una respuesta más favorable en un paciente individual o respuesta promedio en una población de pacientes en relación con una respuesta promedio en una población control que no recibe tratamiento.

[0189] Para los fines de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras):

cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

[0190] El porcentaje de identidades de secuencia se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región de anticuerpo sujeto (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se compara con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo sujeto y de referencia es el número de las posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región del anticuerpo de referencia como en la del sujeto divididas entre el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar las brechas, multiplicado por 100 para convertir en porcentaje.

[0191] Las composiciones o métodos “que comprenden” o “que incluyen” uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos que no se mencionan específicamente. Por ejemplo, una composición que “comprende” o “incluye” un anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

[0192] La designación de un rango de valores incluye todos los números enteros dentro de, o que definen el rango, y todos los subrangos definidos por números enteros dentro del rango.

[0193] A menos que el contexto indique lo contrario, el término “aproximadamente” abarca variaciones no sustanciales, tales como los valores dentro de un margen estándar de error de medición (por ejemplo, SEM) de un valor establecido.

[0194] Relevancia estadística significa $p \leq 0.05$.

[0195] Las formas singulares de los artículos “un”, “una”, “uno”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

[0196] La invención proporciona anticuerpos que se unen a tau. Algunos anticuerpos se unen específicamente a epítomos dentro de la región de unión microtubular (MTBR) de tau humana. Algunos anticuerpos se unen a tau independientemente del estado de fosforilación. Algunos anticuerpos de la invención sirven para inhibir o retrasar las patologías asociadas con tau y el deterioro sintomático asociado. Aunque no se requiere una comprensión del mecanismo para la práctica de la invención, puede producirse una reducción de la toxicidad como resultado de la fagocitosis de tau que induce el anticuerpo, inhibiendo tau de la agregación inter o intramolecular, o de la unión a otras moléculas, estabilizando una no-formación tóxica, mediante la inhibición de la transmisión intercelular o intracelular de formas tau patógenas, mediante el bloqueo de la fosforilación de tau, mediante la prevención de la unión de tau a las células, o mediante la inducción de la escisión proteolítica de tau, entre otros mecanismos. Los anticuerpos de la invención o los agentes que inducen dichos anticuerpos pueden usarse en métodos de tratamiento o realización de profilaxis de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades asociadas con tau.

II. Moléculas objetivo

[0197] A menos que se vea lo contrario en el contexto, la referencia a tau significa una forma humana natural de tau que incluye todas las isoformas, independientemente de si está presente una modificación postraducciona (por ejemplo, fosforilación, glicación o acetilación). Hay seis isoformas principales (variantes de empalme) de tau que ocurren en el cerebro humano. La más larga de estas variantes tiene 441 aminoácidos, de los cuales el residuo met inicial se escinde. Los residuos se numeran según la isoforma 441. Así, por ejemplo, la referencia a una fosforilación en la posición 404 significa la posición 404 de la forma iso 441, o la posición correspondiente de cualquier otra isoforma cuando está alineado al máximo con la isoforma 441. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas y los números de Prot. Suizo se indican a continuación.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>		
	MAEPRQEFEV		MEDHAGTYGL		GDRKDQGGYT		MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
	PTEDGSEEPG							
5	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>		
	SETSDAKSTP		TAEDVTAPLV		DEGAPGKQAA		AQPHTEIPEG	TTAEEAGIGD
	TPSLEDEAAG							
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>		
	HVTQARMVSK		SKDGTGSDDK		KAKGADGKTK		IATPRGAAPP	GQKGQANATR
10	IPAKTPPAPK							
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>		
	TPPSSGEPPK		SGDRSGYSSP		GSPGTPGSRS		RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR
	TPPKSPSSAK							
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>		
15	SRLQTAPVPM		PDLKNVKSKI		GSTENLKHQP		GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK
	CGSKDNIKHV							
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>		
	PGGGSVQIVY		KPVDLSKVTS		KCGSLGNIHH		KPGGGQVEVK	SEKLDFKDRV
	QSKIGSLDNI							
20	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>		
	THVPGGGNKK		IETHKLTFRE		NAKAKTDHGA		EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN
	VSSTGSIDMV							
	<u>430</u>	<u>440</u>						
	DSPQLATLAD EVSASLAKQG L							

25

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>		
	MAEPRQEFEV		MEDHAGTYGL		GDRKDQGGYT		MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
	PTEDGSEEPG							
30	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>		

	SETSDAKSTP	TAEAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD
	KKAKGADGKT				
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>
	<u>180</u>				
5	KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS
	PGSPGTPGSR				
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>
	<u>240</u>				
	SRTPSLPTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVKS
	IGSTENLKHQ				
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>
	<u>300</u>				
10	PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGSVQIV	YKPVDLSKVT
	SKCGSLGNIH				
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>
	<u>360</u>				
	HKPGGGQVEV	KSEKLDFKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR
	ENAKAKTDHG				
15	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>
	AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ
	GL				
	P10636-6 (4R0N tau humana) (SEQ ID NO:3)				
	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
	<u>60</u>				
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI
20	GDTPSLEDEA				
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>
	<u>120</u>				
	AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA
	TRIPAKTPPA				
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>
	<u>180</u>				
25	PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV
	VRTPPKSPSS				
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>
	<u>240</u>				
	AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ

35

SKCGSKDNIK

250 260 270 280 290 300

HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLD FKD
RVQSKIGSLD

5

310 320 330 340 350 360

NITHVPGGGN KKIETHKLT F RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
370 380

MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAE EAGIGD
TPSLEDEAAG

15

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR
TPPKSPSSAK

20

250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNV KSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK
CGSLGNIHHK

25

310 320 330 340 350 360

PGGGQVEVKS EKLD FKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLT FREN
AKAKTDHGAE

370 380 390 400 410

IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

30

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

36

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>		
	MAEPRQEFEV		MEDHAGTYGL		GDRKDQGGYT		MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
	PTEDGSEEPG							
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>		
5	SETSDAKSTP		TAEAE EAGIG		DTPSLEDEAA		GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD
	KKAKGADGKT							
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>		
	KIATPRGAAP		PGQKGQANAT		RIPAKTPPAP		KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS
	PGSPGTPGSR							
10	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>		
	SRTPSLPTPP		TREPKKVAVV		RTPPKSPSSA		KSRLQTAPVP	MPDLKNVKS
	IGSTENLKHQ							
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>		
	PGGGKVQIVY		KPVDLSKVTS		KCGSLGNIHH		KPGGGQVEVK	SEKLDFKDRV
15	QSKIGSLDNI							
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>		
	THVPGGGNKK		IETHKLTFRE		NAKAKTDHGA		EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN
	VSSTGSIDMV							
	<u>370</u>	<u>380</u>						
20	DSPQLATLAD		EVSASLAKQG	L				

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

	10	20	30	40	50	60		
	MAEPRQEFEV		MEDHAGTYGL		GDRKDQGGYT		MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI
25	GDTPSLEDEA							
	70	80	90	100	110	120		
	AGHVTQARMV		SKSKDGTGSD		DKKAKGADGK		TKIATPRGAA	PPGQKGQANA
	TRIPAKTPPA							

130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV
 5 VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDSLKVT
 SKCGSLGNIH
 10 250 260 270 280 290 300
 HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
 ENAKAKTDHG
 15 310 320 330 340 350
 AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

[0198] La referencia a tau incluye variaciones naturales conocidas de las cuales 30 están
 incluidas en la base de datos Prot. Suizo y sus permutaciones, así como las mutaciones
 asociadas con patologías tau, como la demencia, la selección de enfermedad, parálisis
 20 supranuclear, etc. (ver, por ejemplo, la base de datos Prot. Suizo y Poorkaj, et al. *Ann
 Neurol.* 43:815-825 (1998)). Algunos ejemplos de mutaciones tau numeradas por la
 isoforma 441 son una mutación de lisina a treonina en el residuo de aminoácido 257
 (K257T), una mutación de isoleucina a valina en la posición de aminoácido 260 (I260V); una
 mutación de glicina a valina en la posición de aminoácido 272 (G272V); una mutación de
 25 asparagina a lisina en la posición del aminoácido 279 (N279K); una mutación de asparagina
 a histidina en la posición del aminoácido 296 (N296H); una mutación de prolina a serina en
 la posición del aminoácido 301 (P301S); una mutación de prolina a leucina en el aminoácido
 301 (P301L); una mutación de glicina a valina en la posición del aminoácido 303 (G303V);
 una mutación de serina a asparagina en la posición 305 (S305N); una mutación de glicina
 30 a serina en la posición de aminoácido 335 (G335S); una mutación de valina a metionina en

la posición 337 (V337M); una mutación de ácido glutámico a valina en la posición 342 (E342V); una mutación de lisina a isoleucina en la posición del aminoácido 369 (K369I); una mutación de glicina a arginina en la posición del aminoácido 389 (G389R); y una mutación de arginina a triptófano en la posición del aminoácido 406 (R406W).

5 [0199] Tau puede ser fosforilada en uno o más residuos de aminoácidos, incluida la tirosina en las posiciones de aminoácidos 18, 29, 97, 310 y 394 serina en las posiciones de aminoácidos 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 y 422; y treonina en las posiciones de aminoácidos 175, 181, 205, 212, 217, 231 y 403.

10 A menos que se vea lo contrario en el contexto, la referencia a tau, o sus fragmentos, incluye las secuencias de aminoácidos humanos naturales que incluyen isoformas, mutantes y variantes alélicas de los mismos.

III. Anticuerpos

15 A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

[0200] La invención proporciona anticuerpos que se unen a tau. Algunos anticuerpos se unen específicamente a epítomos dentro de la región de unión microtubular (MTBR) de tau humana. Algunos anticuerpos se unen a tau independientemente del estado de fosforilación. Algunos anticuerpos se unen a un epítopo que no incluye un residuo sujeto a fosforilación.

20 Estos anticuerpos pueden obtenerse inmunizándose con un polipéptido tau purificado de una fuente natural o expresado de forma recombinante. Los anticuerpos pueden cribarse para la unión de tau en forma no fosforilada, así como una forma en la que uno o más residuos susceptibles de fosforilación están fosforilados. Dichos anticuerpos se unen preferiblemente con afinidades indistinguibles o al menos dentro de un factor de 1.5, 2 o 3

25 veces a tau fosforilada en comparación con tau no fosforilada (es decir, son “específicas de pan”). 3D6 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal específico de pan. La invención también proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítopo que cualquiera de los anticuerpos anteriores, tales como, por ejemplo, el epítopo de 3D6. También se incluyen los anticuerpos que compiten por unirse a tau con cualquiera de los anticuerpos anteriores,

30 como, por ejemplo, que compiten con 3D6.

[0201] A menos que se vea lo contrario en el contexto, la referencia a 3D6 debe entenderse como una referencia a cualquiera de las formas de ratón, quiméricas, revestidas y humanizadas de este anticuerpo. El anticuerpo se ha depositado como [NÚMERO DE DEPÓSITO]. Este anticuerpo se une específicamente dentro de la región MTBR de SEQ ID NO: 1). Este anticuerpo se caracteriza además por su capacidad para unirse tanto a la tau fosforilada como a la no fosforilada, a las formas y conformaciones no patológicas y patológicas de la tau, y a las formas de la tau mal plegadas/agregadas. Un anticuerpo designado como 6A10 es otro de tales anticuerpos de ratón ejemplares. A menos que se vea lo contrario en el contexto, la referencia a 6A10 debe entenderse como una referencia a cualquiera de las formas de ratón, quiméricas, revestidas y humanizadas de este anticuerpo. Las CDR compuestas de Kabat/Chothia de la cadena pesada de 6A10 se designan las SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente, y las CDR de Kabat de la cadena ligera de 6A10 se designan las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente. El 6A10 de ratón comparte el 82.1% de la identidad de secuencia VH y el 100% de identidad de secuencia VL con la cadena VH y la cadena VL, respectivamente, del 3D6 de ratón.

[0202] Algunos anticuerpos de la invención se unen al mismo epítipo o se superponen como un anticuerpo designado 3D6. Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera maduras de este anticuerpo se designan como SEQ ID NOS: 7 y 11, respectivamente.

[0203] Los CDR de Compuesto de Kabat/Chothia de cadena pesada de 3D6 se designan como SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las CDR de Kabat de cadena ligera de 3D6 se designan como SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente.

[0204] La Tabla 2 indica los CDR de 3D6 definidos por Kabat, Chothia, Compuesto de Chothia y Kabat (también referido aquí como “Compuesto de Kabat/Chothia”), AbM y Contacto.

Tabla 2: 3D6 de CDR según lo definido por Kabat, Chothia, Compuesto de Kabat y Chothia, AbM, y Contacto

Bucle	Kabat	Chothia	Compuesto de Chothia y Kabat	AbM	Contacto
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO: 36
L2	L50--L56 SEQ ID NO:13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L46--L55 SEQ ID NO: 37
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L96 SEQ ID NO:38
H1	H31--H35B SEQ ID NO: 32	H26--H32 SEQ ID NO:33	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:39
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H52--H56 SEQ ID NO:34	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H50--H58 SEQ ID NO:35	H47--H58 SEQ ID NO:40
H3	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H93--H101 SEQ ID NO:41

[0205] Se pueden obtener otros anticuerpos mediante mutagénesis de ADNc que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo ejemplar, tal como el 3D6. Los anticuerpos monoclonales que son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a 3D6 u otro anticuerpo ejemplificado o cadena de anticuerpos en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera maduras y mantienen sus propiedades funcionales, y/o que difieren del anticuerpo respectivo en un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente intrascendentes (por ejemplo,

sustituciones conservativas), eliminaciones o inserciones también se incluyen en la invención. También se incluyen los anticuerpos monoclonales que tienen al menos una o todas las seis CDR como se define en cualquier definición convencional, pero preferiblemente Kabat, que son 90%, 95%, 99% o 100% idénticas a las CDR correspondientes de 3D6.

[0206] La invención también proporciona anticuerpos que tienen algunas o todas las CDR (por ejemplo, 3, 4, 5 y 6) en su totalidad o sustancialmente de 3D6. Dichos anticuerpos pueden incluir una región variable de cadena pesada que tiene al menos dos, y generalmente las tres, CDR total o sustancialmente de la región variable de cadena pesada de 3D6 y/o una región variable de cadena ligera que tiene al menos dos, y generalmente las tres CDR total o sustancialmente de la región variable de cadena ligera de 3D6. Los anticuerpos pueden incluir tanto cadenas pesadas como ligeras. Una CDR es sustancialmente de una CDR 3D6 correspondiente cuando no contiene más de 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o eliminaciones, excepto que la CDR-H2 (cuando está definida por Kabat) no puede tener más de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o eliminaciones. Dichos anticuerpos pueden tener al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con 3D6 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera maduras y mantienen sus propiedades funcionales, y/o difieren de 3D6 por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente intrascendentes (por ejemplo, sustituciones conservativas), deleciones o inserciones.

[0207] Algunos anticuerpos identificados por dichos ensayos pueden unirse a formas de tau monoméricas, mal plegadas, agregadas, fosforiladas o sin fosforilar. Asimismo, algunos anticuerpos son inmunorreactivos en formas no patológicas y patológicas y conformaciones de tau.

B. Anticuerpos Humanizados

[0208] Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDR de un anticuerpo “donante” no humano se injertan en secuencias de anticuerpos “aceptores” humanos (véase, por ejemplo, Queen, US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; y Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpos aceptoras pueden ser, por ejemplo, una secuencia de

anticuerpos humanos maduros, un compuesto de tales secuencias, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpos humanos o una secuencia de región de línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene al menos tres, cuatro, cinco o todas las CDR total o sustancialmente de un donante y secuencias

5 estructurales de región variable y regiones constantes, si están presentes, total o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. De forma similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y, por lo general, las tres CDR, total o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante, y una secuencia marco de la región variable de cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, si está

10 presente, sustancialmente de la región variable de cadena pesada humana Marco y secuencias de regiones constantes. De manera similar, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y, por lo general, las tres CDR, total o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donante, y una secuencia marco de la región variable de cadena ligera y una región constante de la cadena ligera, si están presentes, sustancialmente de la región

15 variable de cadena ligera humana y secuencias marco de regiones constantes. Aparte de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (como lo define

20 cualquiera definición convencional pero preferiblemente definida por Kabat) son idénticas entre las respectivas CDR. Las secuencias marco de la región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia marco de la región variable humana o región constante humana, respectivamente, cuando al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos

25 correspondientes definidos por Kabat son idénticos. Para ser clasificado como humanizado según la definición de anticuerpos humanizados de los nombres no exclusivos internacionales (INN) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2014, un anticuerpo debe tener al menos un 85% de identidad con las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana (es decir, antes de la hipermutación somática). Los anticuerpos mixtos

30 son anticuerpos para los cuales una cadena de anticuerpos (por ejemplo, cadena pesada) alcanza el umbral, pero la otra cadena (por ejemplo, cadena ligera) no cumple con el umbral.

Un anticuerpo se clasifica como quimérico si ninguna de las cadenas alcanza el umbral, aun cuando las regiones estructurales variables para ambas cadenas fueron sustancialmente humanas con algunas mutaciones posteriores murinas. Ver, Jones et al. (2016). Los INN y las salidas de los nombres no patentados de anticuerpos, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. Ver también “*WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)*” (Internet) 2014. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>), incorporado aquí como referencia. Para evitar dudas, el término “humanizado” como se usa en el presente documento no pretende limitarse a la definición INN de la OMS de 2014 de anticuerpos humanizados. Algunos de los anticuerpos humanizados proporcionados en este documento tienen al menos un 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana y algunos de los anticuerpos humanizados proporcionados en este documento tienen menos del 85% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana. Algunas de las cadenas pesadas de los anticuerpos humanizados proporcionados en este documento tienen de aproximadamente 60% a 100% de identidad de secuencia con secuencias de líneas germinales humanas, tales como, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 60% a 69%, 70% a 79%, 80% a 84%, o 85% a 89%. Algunas cadenas pesadas están por debajo de la definición INN de la OMS 2014 y tienen, por ejemplo, alrededor del 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% o 82%, 83% o 84% de identidad de secuencia con secuencias de líneas germinales humanas, mientras que otras cadenas pesadas que cumplen con la definición INN de la OMS 2014 tienen aproximadamente el 85%, 86%, 87%, 88%, 89% o mayor identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana. Algunas de las cadenas ligeras de los anticuerpos humanizados proporcionadas en este documento tienen una identidad de secuencia de aproximadamente 60% a 100% con secuencias de líneas germinales humanas, tales como, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 80%. a 84% o 85% a 89%. Algunas cadenas ligeras están por debajo de la definición de INN de la OMS de 2014 y tienen, por ejemplo, aproximadamente el 81%, 82%, 83% o 84% de identidad de secuencia con las secuencias de la línea germinal humana, mientras que otras cadenas ligeras cumplen con la definición de INN de la OMS de 2014 y tienen aproximadamente 85 %, 86%, 87%, 88%, 89% o mayor identidad de

secuencia con secuencias de línea germinal humana. Algunos anticuerpos humanizados proporcionados en este documento que son “quiméricos” según la definición INN de la OMS 2014 tienen cadenas pesadas con menos del 85% de identidad con las secuencias de la línea germinal humana apareadas con cadenas ligeras que tienen menos del 85% de identidad con las secuencias de la línea germinal humana. Algunos anticuerpos humanizados que se proporcionan aquí se “mezclan” bajo la definición de INN de la OMS 2014, por ejemplo, que tienen una cadena pesada con al menos un 85% de identidad de secuencia con secuencias de líneas germinales humanas emparejadas con una cadena ligera que tiene menos de 85% de identidad de secuencia con un germen humano secuencias de líneas, o viceversa. Algunos anticuerpos humanizados proporcionados aquí cumplen con la definición INN de la OMS 2014 de “humanizado” y tienen una cadena pesada con al menos un 85% de identidad de secuencia con secuencias de línea germinal humana apareadas con una cadena ligera que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con secuencias de línea germinal humana. Los anticuerpos humanizados adicionales de la invención cumplen con la definición INN de la OMS de 2014 de “mixtos”.

[0209] Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (definidas por cualquier definición convencional pero preferiblemente según lo definido por Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden fabricarse con menos de todas las CDR (por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 CDR) de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura y otros, *J. Immunol.*, 164: 1432-1441, 2000).

[0210] En algunos anticuerpos, solo una parte de las CDR, a saber, el subconjunto de residuos de CDR necesarios para la unión, denominados SDR, son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDR pueden identificarse según estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDR H2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196: 901, 1987), por modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. En tales anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más residuos de CDR del donante están ausentes o en los que se omite una CDR del donante completo, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un

aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones de aceptor para aminoácidos de donante en las CDR para incluir refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial y/o para cumplir con la definición INN de la OMS de “humanizado”. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

[0211] Las secuencias de anticuerpos aceptores humanos pueden seleccionarse opcionalmente entre las muchas secuencias de anticuerpos humanos conocidas para proporcionar un alto grado de identidad de secuencia (por ejemplo, 65 85% de identidad) entre los marcos de la región variable de la secuencia del aceptor humano y los correspondientes marcos de la región variable de una cadena de anticuerpo donante.

[0212] Un ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena pesada es la región variable de cadena pesada madura humana de Fab 48G7 humanizado con código de acceso PDB 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO: 75). Los dominios variables de 3D6 y 48G7 Fab también comparten longitudes idénticas para los bucles CDR-H1, H2. Otro ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena pesada es la región variable de la cadena pesada madura humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25). IMGT No. IGHV1-69-2 * 01 (SEQ ID NO: 25) comparte la forma canónica de CDR-H1 y H2 de cadena pesada 3D6 de ratón. IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) pertenece al subgrupo 1 de la cadena pesada humana. Un ejemplo de una secuencia aceptora de la cadena ligera es la región variable de la cadena ligera madura humana con el anticuerpo humano de código de acceso PDB ARX71335 VL (SEQ ID NO: 82). El dominio ligero variable del anticuerpo 3D6 y ARX71335 también comparte longitudes idénticas para los bucles CDR-L1, L2 y L3. Otro ejemplo de una secuencia aceptora para la cadena ligera es la región variable de cadena ligera madura humana con IMGT No. IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27). IMGT No. IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) tiene las mismas clases canónicas para CDR-L1, CDR-L2 y L3 que el 3D6 de ratón. IMGT No. IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) pertenece al subgrupo kappa humano 2.

[0213] Si se selecciona más de una secuencia de anticuerpo aceptor humano, se puede usar un compuesto o híbrido de esos aceptores, y los aminoácidos usados en diferentes posiciones en las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada humanizadas pueden tomarse de cualquiera de las secuencias de anticuerpos aceptores humanos utilizadas. Por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada humana madura de IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) y el código de acceso de PDB No. 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO: 75) se utilizaron como secuencias aceptoras para la humanización de la región variable de cadena pesada madura de 3D6. Un ejemplo de posiciones en las que estos dos aceptores difieren es la posición H17 (T o S). Las versiones humanizadas de la región variable de cadena pesada de 3D6 pueden incluir cualquier aminoácido en esta posición. Por ejemplo, las regiones variables de cadena ligera madura humana IMGT No. IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) y el código PDB No. ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO: 82) se usaron como secuencias aceptoras para región variable de cadena ligera madura 3D6. Un ejemplo de una posición en la que estos dos aceptores difieren es la posición L100 (Q o A). Las versiones humanizadas de la región variable de cadena ligera 3D6 pueden incluir cualquier aminoácido en esta posición.

[0214] Ciertos aminoácidos de los residuos del marco de la región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias se realiza mediante el modelado, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares.

[0215] Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humano seleccionado, el aminoácido de marco humano puede sustituirse por el aminoácido de marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido ácido:

- (1) se una de manera no covalente al antígeno directamente;
- (2) sea adyacente a una región CDR o dentro de una CDR como la define Chothia pero no Kabat;
- (3) de lo contrario, interactúe con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6Å de una región CDR), (por ejemplo, identificada mediante el modelado

de la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina homóloga conocida); o

(4) sea un residuo que participa en la interfaz VL-VH.

[0216] La invención proporciona formas humanizadas del anticuerpo 3D6 murino que incluyen 7 regiones variables maduras de cadena pesada humanizada ejemplificadas (hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO: 76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO: 77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO: 78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO: 79), hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO: 80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO: 90) y hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91)) y 3 regiones variables de cadena ligera madura humanizada ejemplificadas (hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO: 83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO: 84) y hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85)).

[0217] En una modalidad, las secuencias humanizadas se generan utilizando un protocolo de PCR de dos etapas que permite la introducción de múltiples mutaciones, deleciones e inserciones utilizando la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Wang, W. y Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26: 680-682).

[0218] Los residuos del marco de las clases (1) a (3) como se define en Queen, US 5,530,101, a veces se denominan, alternativamente, residuos canónicos y de vernier. Los residuos del marco que ayudan a definir la conformación de un bucle de CDR a veces se denominan residuos canónicos (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton y Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800 815 (1996)). Los residuos del marco que soportan las conformaciones del bucle de unión al antígeno y desempeñan un papel en el ajuste fino del ajuste de un anticuerpo al antígeno a veces se denominan residuos de vernier (Foote y Winter, *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 (1992)).

[0219] Otros residuos del marco que son candidatos para la sustitución son los residuos que crean un sitio potencial de glicosilación. Todavía otros candidatos para la sustitución son aminoácidos del marco humano aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de las inmunoglobulinas humanas más típicas.

[0220] Otros residuos del marco que son candidatos para la sustitución son los residuos de glutamina N-terminales (Q) que pueden reemplazarse con ácido glutámico (E) para minimizar el potencial de conversión de piroglutamato [Y. Diana Liu, et al., 2011, *J. Biol.*

Chem., 286: 11211-11217]. La conversión del ácido glutámico (E) en piroglutamato (pE) ocurre más lentamente que a partir de la glutamina (Q). Debido a la pérdida de una amina primaria en la conversión de glutamina a pE, los anticuerpos se vuelven más ácidos. La conversión incompleta produce heterogeneidad en el anticuerpo que puede observarse como múltiples picos, utilizando métodos analíticos basados en la carga. Las diferencias de heterogeneidad pueden indicar una falta de control del proceso.

[0221] Los ejemplos de anticuerpos humanizados son formas humanizadas del 3D6 de ratón, designado Hu3D6.

[0222] El anticuerpo de ratón 3D6 comprende regiones variables de cadena pesada y ligera maduras que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11, respectivamente. La invención proporciona 7 regiones variables de cadena pesada maduras humanizadas ejemplificadas: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7. La invención proporciona además 3 regiones variables de cadena ligera madura ejemplificadas hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3. Las Figuras 1 y 2 muestran alineaciones de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, respectivamente, de 3D6 murino y varios anticuerpos humanizados.

[0223] Por razones tales como la posible influencia en la conformación de CDR y/o unión al antígeno, la mediación de la interacción entre cadenas pesadas y ligeras, interacción con la región constante, siendo un sitio para la modificación postraducciona l deseada o no deseada, siendo un residuo inusual para su posición en una secuencia de región variable humana y, por lo tanto, potencialmente inmunogénica, la obtención de potencial de agregación, y otras razones, las siguientes 31 posiciones marco de región variable se consideraron candidatas para sustituciones en las 3 regiones variables de cadena ligera madura humana ejemplificadas y las 7 regiones variables de cadena pesada maduras humanas ejemplificadas, como se especifica con más detalle en los ejemplos: L7 (T7S, de línea germinal), L10 (T10S, de línea germinal), L15 (I15L, de línea germinal), L17 (Q17E, para mejorar la estabilidad), L37 (L37Q, de línea germinal), L45 (K45R, de línea germinal), L83 (L83V, de línea germinal), L86 (H86Y, de ratón 3D6), L100 (A100Q, de línea germinal), L106 (L106I, de línea germinal)), H1 (Q1E, de 3D6 de ratón), H5 (Q5V, de línea germinal), H11 (L11V, de línea germinal), H17 (S17T, de línea germinal), H20 (L20I, de línea germinal),

H23 (T23K, de línea germinal), H38 (K38R, de ratón 3D6), H42 (E42G, de línea germinal), H43 (Q43K, de línea germinal), H66 (K66R, de línea germinal), H67 (A67V, de línea germinal), H75 (S75T, de línea germinal), H76 (N76D, de línea germinal), H80 (L80M, de línea germinal), H81 (Q81E, de línea germinal), H83 (T83R, de línea germinal), H91 (Y91F, de ratón 3D6), H93 (A93S, de ratón 3D6), H94 (S94T, de ratón 3D6), H108 (T108L, de línea germinal) y H109 (L109V, de línea germinal). Aquí y en otros lugares al describir las sustituciones, los comentarios entre paréntesis indican una justificación para una sustitución. Algunas sustituciones tienen múltiples justificaciones. Las siguientes 5 posiciones de CDR de región variable se consideraron candidatas para sustituciones en las 3 regiones variables de cadena ligera madura humana ejemplificadas y las 7 regiones variables de cadena pesada madura humana ejemplificadas, como se especifica adicionalmente en los ejemplos: L24 (K24R, de línea germinal), H28 (N28T, de línea germinal), H54 (N54D, de línea germinal), H56 (D56E, de línea germinal) y H58 (V58I, de línea germinal). En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-H1 Compuesto de Kabat-Chothia tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86, y CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-H1 Compuesto de Kabat-Chothia tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 88. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-H1 Compuesto de Kabat-Chothia tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 92. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-L1 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89.

[0224] Aquí al igual que en lo demás, el primer residuo mencionado es el residuo de un anticuerpo humanizado formado injertando CDRs de Kabat o un CDR de Compuesto de Chothia-Kabat en el caso de CDR-H1 en un marco de aceptor humano, y el segundo residuo mencionado es un residuo que se considera para reemplazar dicho residuo. Por lo tanto, dentro de los marcos de región variable, el primer residuo mencionado es humano, y dentro de los CDRs, el primer residuo mencionado es de ratón.

[0225] Los anticuerpos ejemplificados incluyen cualquier permutaciones o combinaciones de las regiones variables de cadena ligera y pesada madura ejemplificadas VHvb1/VLvb1, VHvb1/VLvb2, VHvb1/VLvb3, VHvb2/VLvb1, VHvb2/VLvb2, VHvb2/VLvb3, VHvb3/VLvb1, VHvb3/VLvb2, VHvb3/VLvb3, VHvb4/VLvb1, VHvb4/VLvb2, VHvb4/VLvb3, VHvb5/VLvb1, VHvb5/VLvb2, VHvb5/VLvb3, VHvb6/VLvb1, VHvb6/VLvb2, VHvb6/VLvb3, VHvb7/VLvb1, VHvb7/VLvb2, VHvb7/VLvb3.

[0226] Los anticuerpos ejemplificados incluyen cualesquiera permutaciones o combinaciones de las regiones variables de la cadena pesada madura ejemplificadas hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO: 76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO: 77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO: 78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO : 79), hu3D6Hvb5 (SEQ ID NO: 80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO: 90) y hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91) con cualquiera de las regiones variables de cadena ligera de 3D6VL humanizadas hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20), hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21), hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22) y hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 22). Los anticuerpos ejemplificados incluyen cualesquiera permutaciones o combinaciones de las regiones variables de cadena ligera madura ejemplificadas hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO: 83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO: 84) o hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85) con cualquiera de las regiones variables de cadena pesada de 3D6V6 humanizadas hu3D6VHv1 (SEQ ID NO: 15); hu3D6VHv2 (SEQ ID NO: 16); hu3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17); hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18); hu3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19); hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46); hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47); hu3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48); hu3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49); hu3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50); hu3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51); hu3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52); hu3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53); hu3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54); hu3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55); hu3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56); y hu3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57).

[0227] La invención proporciona variantes del anticuerpo humanizado 3D6 en el que la región variable de cadena pesada madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO: 76), hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO: 77), hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO: 78), hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO: 79), hu3D6Hvb5 (SEQ ID NO: 80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO: 90), o hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91) y la región variable de cadena ligera madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO: 83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO: 84)

o hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85). En algunos de estos anticuerpos, al menos 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, o todas las 36 retromutaciones u otras mutaciones en las SEQ ID NO: 76-80, SEQ ID NO: 90- 91 y SEQ ID NO: 83-85) se retienen. Algunos de tales anticuerpos humanizados contienen el mismo conjunto de retromutaciones u otras mutaciones que en las secuencias ejemplificadas que definen la identidad de secuencia.

[0228] Así, por ejemplo, la invención incluye anticuerpos humanizados que tienen una región variable de cadena pesada madura con al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 77, y el mismo conjunto de mutaciones que se enumeran en la Tabla 6 de SEQ ID NO: 77, y tres CDR de SEQ ID NO: 77, y una región de cadena ligera madura con al menos 90%, 95% , 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID 84 u 85, y el mismo conjunto de mutaciones que se enumeran en la Tabla 7 para SEQ ID NO: 84 u 85 respectivamente, y tres CDR de SEQ ID NO: 84 u 85 respectivamente. Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 77 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 84 u 85.

[0229] La invención también incluye anticuerpos humanizados que tienen una región variable de cadena pesada madura con al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la región variable de cadena pesada madura de SEQ. ID NO: 90, y el mismo conjunto de mutaciones que se enumeran en la Tabla 6 para SEQ ID NO: 90, y tres CDR de SEQ ID NO: 90, y una región de cadena ligera madura con al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 84 u 85, y el mismo conjunto de mutaciones que se enumeran en la Tabla 7 para SEQ ID NO: 84 u 85 respectivamente, y tres CDR de SEQ ID NO: 84 u 85 respectivamente. Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura de SEQ ID NO: 90 y una región variable de cadena ligera madura de SEQ ID NO: 84 u 85.

[0230] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H93 está ocupada por S y H94 está ocupada por T. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H93 y H94 (residuos Vernier) están ocupadas por S y T, respectivamente, como es el caso de, por ejemplo, huVHvb1, huVHvb2, huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 y huVHvb7.

[0231] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición H91 (residuo de interfaz) en la región VH está ocupada por F, como es el caso, por ejemplo, en huVHvb1, huVHvb2 y huVHvb6.

[0232] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por E, H5 está ocupada por V, H11 está ocupada por V, H20 está ocupada por I, H23 está ocupada por K, H38 está ocupada por R, H42 está ocupada por G, H43 está ocupada por K, H66 está ocupada por R, H75 está ocupada por T, H76 está ocupada por D, H81 está ocupada por E, H108 está ocupada por L, H109 está ocupada por V. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L y V, respectivamente, como es el caso en, por ejemplo, huVHvb2, huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 y huVHvb7.

[0233] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H17 está ocupada por T, H80 está ocupada por M, H83 está ocupada por R. En algunos anticuerpos humanizados 3D6, las posiciones H17, H80 y H83 en la región VH están ocupadas por T, M y R, respectivamente, como es el caso en, por ejemplo, huVHvb3, huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 y huVHvb7.

[0234] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición H58 (residuo CDR-H2) en la región VH está ocupada por I, como es el caso, por ejemplo, en huVHvb3, huVHvb4 y huVHvb5.

[0235] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H28 está ocupada por T, H67 está ocupada por V. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H28 y H67 en la región VH están ocupadas por T y V, respectivamente, como es el caso, por ejemplo, en huVHvb4, huVHvb5, huVHvb6 y huVHvb7.

[0236] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H54 está ocupada por D, H56 está ocupada por E. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H54 y H56

(residuos de CDR-H2) en la región VH están ocupadas por D y E, respectivamente, como es el caso en, por ejemplo, huVHvb6 y huVHvh7.

[0237] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por Q o E, H5 está ocupada por Q o V, H11 está ocupada por L o V, H17 está ocupada por S o T, H20 está ocupada por L o I, H23 está ocupada por T o K, H28 está ocupada por N o T, H38 está ocupada por K o R, H42 está ocupada por E o G, H43 está ocupada por Q o K, H54 está ocupada por N o D, H56 está ocupada por D o E, H58 está ocupada por V o I, H66 está ocupada por K o R, H67 está ocupada por A o V, H75 está ocupada por S o T, H76 está ocupada por N o D, H80 está ocupada por L o M, H81 está ocupada por Q o E, H83 está ocupada por T o R, H91 está ocupada por F o Y, H93 está ocupada por S, H94 está ocupada por T, H108 está ocupada por T o L, H109 está ocupada por L o V.

[0238] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H91, H93 y H94 en la región VH están ocupadas por F, S y T, respectivamente, como en huVHvb1. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H91, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L y V, respectivamente, como en huVHvb2. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, R, G, K, I, R, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente, como en huVHvb3. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L, y V, respectivamente, como en huVHvb4. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente, como en huVHvb5. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91, H93, H94, H108 y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, F, S, T, L y V, respectivamente, como en

huVHvb6. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, y H109 en la región VH están ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente, como en huVHvb7.

5 [0239] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 está ocupada por S, L10 está ocupada por S, L15 está ocupada por L, L83 está ocupada por V, L86 está ocupada por Y y L106 está ocupada por I. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 están ocupadas por S, S, L, V, Y e Y, respectivamente, como
10 es el caso de, por ejemplo, huVHvb2 y huVLvb3.

[0240] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido como se especifica: L7 es T o S, L10 es T o S, L15 es I o L, L17 es Q o E, L24 es K o R, L37 es L o Q, L45 es K o R, L83 es L o V, L86 es H o Y, L100 es A o Q, L106 es L o I.

15 [0241] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 en la región VL están ocupadas por S, S, L, V, Y e I, respectivamente, como en huVLvb2. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100 y L106 en la región VL están ocupadas por S, S, L, E, R, Q, R, V, Y, Q e I, respectivamente, como en huVLvb3.

20 [0242] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la cadena pesada variable tiene $\geq 85\%$ de identidad con la secuencia humana. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la cadena ligera variable tiene una identidad $\geq 85\%$ con la secuencia humana. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, cada una de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable tiene $\geq 85\%$ de identidad con la secuencia de la línea germinal humana. En algunos
25 anticuerpos 3D6 humanizados, las tres CDR de cadena pesada son las definidas por el Compuesto de Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9 y 10) y las tres CDR de cadena ligera son las definidas por el Compuesto de Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13 y 14); siempre que la posición H28 esté ocupada por N o T, la posición H54 esté ocupada por N o D, la posición H56 esté ocupada por D o E, la posición H58 esté ocupada por V o I y la posición L24 esté
30 ocupada por K o R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, el Compuesto de Kabat/Chothia CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:

86. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 92. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, CDR-L1 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89.

5 [0243] Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados pueden ser idénticas o sustancialmente idénticas a las regiones CDR de 3D6. Las regiones CDR pueden definirse por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia o compuesto de Chothia y Kabat), pero son preferiblemente como las define Kabat.

10 [0244] Las posiciones del marco de las regiones variables están de acuerdo con la numeración de Kabat a menos que se indique lo contrario. Otras variantes de este tipo difieren típicamente de las secuencias de las cadenas pesada y ligera de Hu3D6 ej. en un pequeño número (por ejemplo, típicamente no más de 1, 2, 3, 5, 10 o 15) sustituciones, supresiones o inserciones. Estas diferencias suelen estar en el marco, pero también pueden ocurrir en los CDR.

15 [0245] Una posibilidad de variación adicional en las variantes 3D6 humanizadas es retromutaciones adicionales en los marcos de la región variable. Muchos de los residuos del marco que no están en contacto con las CDR en el mAb humanizado pueden albergar sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes del mAb de ratón donante u otros anticuerpos de ratón o humanos, e incluso muchos residuos potenciales de contacto
20 con CDR también son susceptibles de sustitución. Incluso los aminoácidos dentro de las CDR pueden alterarse, por ejemplo, con los residuos encontrados en la posición correspondiente de la secuencia del aceptor humano utilizada para suministrar estructuras de región variable. Además, se pueden usar secuencias aceptoras humanas alternativas, por ejemplo, para la cadena pesada y/o ligera. Si se utilizan diferentes secuencias de
25 aceptor, es posible que una o más de las mutaciones de respaldo recomendadas anteriormente no se realicen porque los residuos correspondientes de donante y aceptor ya son los mismos sin las mutaciones de respaldo.

[0246] Preferiblemente, las sustituciones o las mutaciones en las variantes 3D6 humanizadas (sean o no conservadoras) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o
30 potencia de unión del mAb humanizado, es decir, su capacidad para unirse a tau.

[0247] Los anticuerpos 3D6 humanizados se caracterizan además por su capacidad para unirse a formas tau fosforiladas y no fosforiladas y mal plegadas/agregadas. Algunos anticuerpos humanizados se caracterizan por unirse a la tau humana o por poseer otras propiedades funcionales, tales como inhibición de la unión de tau a células neuronales o desagregación de tau, igual o más fuertemente que el 3D6 de ratón (por ejemplo, hasta 2x, 5x, 10x o 20x) que el de 3D6 de ratón. Dichas propiedades pueden compararse con cualquiera de los ensayos descritos en los ejemplos.

C. Selección de la Región Constante

[0248] Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, revestidos o humanizados pueden unirse a al menos una parte de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente de complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad dependiente del complemento y los isotipos humanos IgG2 e IgG4 no. La IgG1 y la IgG3 humanas también inducen funciones de efector mediadas por células más fuertes que la IgG2 y la IgG4 humanas. Las regiones constantes de la cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Las convenciones de numeración para regiones constantes incluyen la numeración de la UE (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl Acad EUA*, 63, 78-85 (1969)), numeración de Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, numeración única de IMGT (Lefranc M.-P. et al., IMGT numeración única para los dominios constantes de inmunoglobulina y receptor de células T y los dominios similares a C de la superfamilia de Ig, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185 203 (2005), y la numeración de exones IMGT (Lefranc, supra).

[0249] Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Se pueden hacer sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter et al., Patente estadounidense No. 5,624,821; Tso et al., Patente estadounidense No. 5,834,597; y Lazar et al., *Proc. Natl. Acad*

Sci. EUA 103: 4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Las sustituciones ejemplares incluyen un Gln en la posición 250 y/o un Leu en la posición 428 (la numeración de la UE se usa en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. La sustitución en cualquiera o en todas las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reduce la afinidad por los receptores Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento US 6,624,821). Se puede usar una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Algunos anticuerpos tienen sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de IgG1 humana para reducir las funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y/o 237 en IgG2 humana están sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina (véase, por ejemplo, el documento US 5,624,821). En algunos anticuerpos, se usa una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329 y 331 por numeración de la UE de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, se utiliza una mutación en una o más de las posiciones 318, 320 y 322 por la numeración de la UE de IgG1 humana. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y/o 235 están sustituidas con alanina y/o la posición 329 está sustituida con glicina. En algunos anticuerpos, las posiciones 234 y 235 están sustituidas con alanina. En algunos anticuerpos, el isotipo es IgG2 o IgG4 humano.

[0250] Una región constante de cadena ligera kappa humana ejemplar tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 (con o sin la arginina de N-terminal). Una región constante de cadena pesada de IgG1 humana tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 (con o sin la lisina de C-terminal). Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena única en los que maduran las cadenas pesada y ligera. Los dominios variables están vinculados a través de un espaciador.

[0251] Las regiones constantes humanas muestran una variación alotípica y una variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes. Así, por ejemplo, otra región constante de cadena pesada

es de IgG1 G1m3 con o sin la lisina C-terminal. La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupen posiciones en alotipos naturales.

D. Expresión de anticuerpos recombinantes

[0252] Se conocen varios métodos para producir anticuerpos quiméricos y humanizados usando una línea celular que expresa anticuerpos (por ejemplo, hibridoma). Por ejemplo, las regiones variables de inmunoglobulina de los anticuerpos pueden clonarse y secuenciarse utilizando métodos bien conocidos. En un método, la región VH variable de la cadena pesada se clona por RT-PCR utilizando ARNm preparado a partir de células de hibridoma. Se emplean cebadores de consenso para el péptido líder de la región VH que abarca el codón de inicio de la traducción como el cebador 5' y un cebador específico de las regiones constantes de g2b 3'. Los cebadores ejemplares se describen en la publicación de patente estadounidense US 2005/0009150 de Schenk et al. (en adelante "Schenk"). Las secuencias de múltiples clones derivados independientemente pueden compararse para garantizar que no se introduzcan cambios durante la amplificación. La secuencia de la región VH también se puede determinar o confirmar mediante la secuenciación de un fragmento VH obtenido mediante la metodología 5' RACE RT-PCR y el cebador específico 3' g2b.

[0253] La región VL variable de cadena ligera se puede clonar de manera análoga. En un enfoque, un conjunto de cebadores de consenso está diseñado para la amplificación de las regiones VL utilizando un cebador 5' diseñado para hibridar con la región VL que abarca el codón de iniciación de la traducción y un cebador 3' específico para la región Ck corriente abajo de la región de unión V-J. En un segundo enfoque, la metodología 5'RACE RT-PCR se emplea para clonar un ADNc que codifica VL. Los cebadores ejemplares se describen en Schenk, supra. Las secuencias clonadas se combinan luego con secuencias que codifican regiones constantes humanas (u otras especies no humanas). Las secuencias ejemplares que codifican las regiones constantes humanas incluyen SEQ ID NO: 105, que codifica una región constante de IgG1 humana (SEQ ID NO: 103), y SEQ ID NO: 106, que codifica una región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO: 104).

[0254] En un enfoque, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se rediseñan para codificar secuencias de donantes de empalme corriente abajo de las respectivas uniones VDJ o VJ y se clonan en un vector de expresión de mamíferos, como pCMV-h γ l para la cadena pesada y pCMV-M κ l para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes de γ 1 y C κ humanos como fragmentos exónicos corriente abajo del casete de región variable insertado. Tras la verificación de la secuencia, los vectores de expresión de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden cotransfectar en células CHO para producir anticuerpos quiméricos. Los medios condicionados se recogen 48 horas después de la transfección y se analizan mediante análisis de transferencia Western para determinar la producción de anticuerpos o ELISA para determinar la unión al antígeno. Los anticuerpos quiméricos se humanizan como se describe anteriormente.

[0255] Los anticuerpos quiméricos, revestidos, humanizados y humanos se producen típicamente por expresión recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, que incluyen elementos de control de expresión asociados de forma natural o heteróloga, tales como un promotor. Las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas o procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

[0256] Estos vectores de expresión generalmente son replicables en los organismos hospedadores como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a la ampicilina o resistencia a la higromicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

[0257] *E. coli* es un huésped procariota útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen la 3-fosfoglicerato quinasa y

otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

[0258] Las células de mamífero pueden usarse para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas de células CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas no productores de anticuerpos, incluidos Sp2/0 y NS0. Las células pueden ser no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Ver Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

[0259] Alternativamente, las secuencias codificantes de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y su posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, la Patente estadounidense No. 5,741,957; la patente estadounidense No. 5,304,489 y la patente estadounidense No. 5,849,992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras y/o pesadas unidas operativamente con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, como la caseína o la beta-lactoglobulina.

[0260] Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos que dependen del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus se puede usar para otros huéspedes celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos

fertilizados o se pueden incorporar al genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células se transfieren a ovocitos enucleados.

[0261] Habiendo introducido vectores que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos en cultivos celulares, se pueden analizar los grupos de células para determinar la productividad de crecimiento y la calidad del producto en medios sin suero. Los grupos de células de mayor producción pueden luego someterse a clonación de una sola célula basada en FACS para generar líneas monoclonales. Se pueden usar productividades específicas de más de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de productos de más de 7.5 g/L de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones de células individuales también se pueden probar para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, exploración UV, HP SEC, mapeo de carbohidratos-oligosacáridos, espectrometría de masas y ensayos de unión, como ELISA o Biacore. Un clon seleccionado puede luego almacenarse en múltiples viales y almacenarse congelados para su uso posterior.

[0262] Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, que incluyen captura de proteína A, purificación por HPLC, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (ver en general, *Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

[0263] Se puede emplear una metodología para la producción comercial de anticuerpos, incluida la optimización de codones, la selección de promotores, la selección de elementos de transcripción, la selección de terminadores, la clonación de células individuales sin suero, los bancos de células, el uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copias, el terminador CHO, o mejora de los títulos de proteínas (véanse, por ejemplo, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; y US 5,888,809). Los anticuerpos también pueden administrarse en forma de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo. Si están presentes tanto cadenas pesadas como ligeras, las cadenas están preferiblemente unidas como un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos para administración pasiva también se pueden preparar, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad a partir de sueros de pacientes tratados con inmunógenos peptídicos.

[0264] El ADN se puede entregar en forma desnuda (es decir, sin materiales coloidales o encapsulantes). Alternativamente, se pueden usar varios sistemas de vectores virales, incluidos los sistemas retrovirales (ver, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)), incluyendo vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, VIH-1 y ALV; vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al, *J. Virol.* 67, 591 1 (1993)); vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores lentivirales tales como los basados en secuencias gag de VIH o FIV, vectores virales de la familia de la viruela que incluyen el virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género del virus alfa como los derivados de los virus de bosque Sindbis y Semliki (véase, por ejemplo, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (ver US 5,643,576) y rabdovirus, como el virus de la estomatitis vesicular (véase WO 96/34625) y papilomavirus (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

[0265] El ADN que codifica un inmunógeno o que codifica las cadenas pesada y/o ligera de anticuerpo, o un vector que contiene el mismo, puede empaquetarse en liposomas. Los lípidos adecuados y los análogos relacionados se describen en los documentos US 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833 y US 5,283,185. Los vectores y el ADN que codifican un inmunógeno, o que codifica las cadenas pesada y/o ligera de anticuerpo, también se pueden adsorber o asociar con vehículos en partículas, cuyos ejemplos incluyen polímeros de polimetacrilato de metilo y polilactidas y poli (lactida-co-glicólidos), (véase, por ejemplo, McGee et al., *J. Micro Encap.* 1996).

[0266] Los vectores o segmentos de los mismos que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpo se pueden incorporar en células *ex vivo*, por ejemplo, a células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas de donante universal, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, normalmente después de la selección de las células que han incorporado los transgenes. (ver, por ejemplo, WO 2017/091512). Las células derivadas de pacientes ejemplares incluyen células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes (iPSC) u otros tipos de células madre (embrionarias, hematopoyéticas, neurales o mesenquimales).

[0267] Se puede introducir un vector o segmento del mismo que codifica las cadenas ligeras y/o pesadas de anticuerpo en cualquier región de interés en las células *ex vivo*, tal como un gen de albúmina u otro gen de puerto seguro. Las células que incorporan el vector pueden implantarse con o sin diferenciación previa. Las células pueden implantarse en un tejido específico, tal como un tejido secretor o un lugar de patología, o sistémicamente, tal como por infusión en la sangre. Por ejemplo, se pueden implantar células en un tejido secretor de un paciente, tal como el hígado, opcionalmente con diferenciación previa a las células presentes en ese tejido, tales como los hepatocitos en el caso de un hígado. La expresión del anticuerpo en el hígado da como resultado la secreción del anticuerpo a la sangre.

E. Ensayos de selección de anticuerpos

[0268] Los anticuerpos pueden seleccionarse inicialmente para la especificidad de unión deseada como se describe anteriormente. Los inmunógenos activos también pueden analizarse para determinar su capacidad para inducir anticuerpos con tal especificidad de unión. En este caso, se usa un inmunógeno activo para inmunizar a un animal de laboratorio y los sueros resultantes se analizan para determinar la especificidad de unión apropiada.

[0269] Los anticuerpos que tienen la especificidad de unión deseada pueden luego probarse en modelos celulares y animales. Las células utilizadas para tal examen son preferentemente células neuronales. Se ha informado un modelo celular de patología tau en el que las células de neuroblastoma se transfectan con un dominio de tau de cuatro repeticiones, opcionalmente con una mutación asociada con la patología tau (por ejemplo, delta K280, véase Khlistunova, *Current Alzheimer Research* 4, 544-546 (2007)). En otro modelo, se induce tau en la línea celular de neuroblastoma N2a mediante la adición de doxiciclina. Los modelos celulares permiten estudiar la toxicidad de tau para las células en estado soluble o agregado, la aparición de agregados de tau después de activar la expresión del gen tau, la disolución de los agregados de tau después de volver a desactivar la expresión del gen y la eficacia de los anticuerpos. en la inhibición de la formación de agregados tau o desagregándolos.

[0270] Los anticuerpos también pueden analizarse en modelos de animales transgénicos de enfermedades asociadas con tau. Dichos animales transgénicos pueden incluir un transgén tau (por ejemplo, cualquiera de las isoformas humanas) y, opcionalmente, un transgén APP

humano, entre otros, como una quinasa que fosforila tau, ApoE, presenilina o alfa sinucleína. Dichos animales transgénicos están dispuestos a desarrollar al menos un signo o síntoma de una enfermedad asociada con tau.

[0271] Un animal transgénico ejemplar es la línea K3 de ratones (Itner et al., *Proc. Natl Acad Sci. EUA* 105 (41):15997-6002 (2008)). Estos ratones tienen un transgén tau humano con una mutación K 369 I (la mutación está asociada con la enfermedad de Pick) y un promotor Thy 1.2. Este modelo muestra un curso rápido de neurodegeneración, déficit motor y degeneración de fibras aferentes y células granulares del cerebelo. Otro animal ejemplar es la línea de ratones JNPL3. Estos ratones tienen un transgén tau humano con una mutación P301L (la mutación está asociada con demencia frontotemporal) y un promotor Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., *Nat. Genet.* 25:402 -405 (2000)). Estos ratones tienen un curso más gradual de neurodegeneración. Los ratones desarrollan enredos neurofibrilares en varias regiones del cerebro y la médula espinal, que se incorporan como referencia en su totalidad. Este es un excelente modelo para estudiar las consecuencias del desarrollo del enredo y para la terapia de detección que puede inhibir la generación de estos agregados. Otra ventaja de estos animales es el inicio relativamente temprano de la patología. En la línea homocigótica, se pueden observar anomalías de comportamiento asociadas con la patología tau al menos tan pronto como a los 3 meses, pero los animales se mantienen relativamente sanos al menos hasta los 8 meses de edad. En otras palabras, a los 8 meses, los animales deambulan, se alimentan y pueden realizar las tareas de comportamiento lo suficientemente bien como para permitir que se controle el efecto del tratamiento. La inmunización activa de estos ratones durante 6-13 meses con - Al wI KLH-PHF-1 títulos generados de aproximadamente 1,000 y mostró menos enredos neurofibrilares, menos pSer422 y una pérdida de peso reducida en relación con los ratones de control sin tratar.

[0272] La actividad de los anticuerpos puede evaluarse mediante diversos criterios que incluyen la reducción en la cantidad de tau total o tau fosforilada, la reducción de otras características patológicas, como los depósitos de amiloide de la A β , y la inhibición o retraso o déficits de comportamiento. Los anticuerpos pueden ser probados para el paso de anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica hacia el cerebro de un animal transgénico. Los anticuerpos o fragmentos que inducen un anticuerpo también pueden

probarse en primates no humanos que, naturalmente o por inducción, desarrollan síntomas de enfermedades caracterizadas por tau. Las pruebas en un anticuerpo se realizan generalmente junto con un control en el que se lleva a cabo un experimento paralelo, excepto que el anticuerpo o el agente activo está ausente (por ejemplo, reemplazado por un vehículo). La reducción, el retraso o la inhibición de los signos o síntomas de enfermedades atribuibles a un anticuerpo o agente activo sometido a prueba pueden evaluarse en relación con el control.

IV. Pacientes Susceptibles de Tratamiento

[0273] La presencia de enredos neurofibrilares se ha encontrado en varias enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, Enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo Guam de demencia por esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo, degeneración corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewy, variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), y parálisis supranuclear progresiva (PSP). Los regímenes actuales también se pueden utilizar en el tratamiento o la profilaxis de cualquiera de estas enfermedades. Debido a la asociación generalizada entre enfermedades y afecciones neurológicas y tau, los regímenes actuales se pueden usar en el tratamiento o la profilaxis de cualquier sujeto que muestre niveles elevados de tau o tau fosforilada (por ejemplo, en el CSF) en comparación con un valor medio en individuos sin neurología enfermedad. Los regímenes actuales también se pueden usar en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad neurológica en individuos que tienen una mutación en tau asociada con la enfermedad neurológica. Los presentes métodos son particularmente adecuados para el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, y especialmente en pacientes.

[0274] Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad pero que no presentan síntomas, así como pacientes que presentan síntomas actualmente. Los pacientes con riesgo de enfermedad incluyen aquellos que tienen un

riesgo genético conocido de enfermedad. Tales individuos incluyen aquellos que tienen parientes que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo incluyen mutaciones en tau, como las analizadas anteriormente, así como mutaciones en otros genes asociados con enfermedades neurológicas. Por ejemplo, el alelo ApoE4 en heterocigotos y aún más en forma homocigótica está asociado con el riesgo de enfermedad de Alzheimer. Otros marcadores de riesgo de enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y posiciones 670 y 671 denominadas mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente, mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, una historia familiar de AD, Hipercolesterolemia o aterosclerosis. Las personas que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas por imágenes de PET, por demencia característica, así como por la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, hay una serie de pruebas de diagnóstico disponibles para identificar a las personas que tienen AD. Estos incluyen la medición de los niveles de CSF tau o de fosfo-tau y A β 42 en LCR. Los niveles elevados de tau o fosfo-tau y la disminución de A β 42 significan la presencia de AD. Algunas mutaciones asociadas a la enfermedad de Parkinson. Ala30Pro o Ala53, o mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como la quinasa de repetición rica en leucina, PARK8. Los individuos también pueden ser diagnosticados con cualquiera de las enfermedades neurológicas mencionadas anteriormente según los criterios del DSM IV TR. [0275] En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Generalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente cumpla 40, 50, 60 o 70 años de edad. El tratamiento generalmente conlleva dosis múltiples durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse analizando los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de pacientes potenciales con síndrome de Down, el tratamiento puede comenzar antes de la administración de un agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

V. Ácidos Nucleicos

[0276] La invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras descritas anteriormente (por ejemplo, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NOs:76-80, SEQ ID NOs:90-91, y SEQ ID NOs:83-85). Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen SEQ ID NOs: 30-31, 93-99, 100-102, y 105-106. Opcionalmente, tales ácidos nucleicos codifican además un péptido señal y pueden expresarse con el péptido señal unido a la región variable de cadena pesada o a la región variable de cadena ligera. Las secuencias codificantes de ácidos nucleicos pueden unirse operativamente con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de la transcripción, y similares. Las secuencias reguladoras pueden incluir un promotor, por ejemplo, un promotor procariota o un promotor eucariota. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas o ligeras pueden estar optimizadas por codón para su expresión en una célula huésped. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden codificar un gen seleccionable. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

VI. Anticuerpos Conjugados

[0277] Los anticuerpos conjugados que se unen específicamente a antígenos, como tau, son útiles para detectar la presencia de tau; monitorear y evaluar la eficacia de los agentes terapéuticos que se utilizan para tratar a los pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo posencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/ demencia de parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewy,

variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP); inhibir o reducir la agregación de tau; inhibir o reducir la formación de fibrillas tau; reducir o limpiar los depósitos de tau; estabilizar las conformaciones no tóxicas de tau; o

5 tratar o efectuar profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefalítico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de

10 esclerosis lateral amiotrófica/demencia de parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT) o parálisis supranuclear progresiva (PSP) en un paciente. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden conjugarse con otros restos terapéuticos, otras proteínas, otros

15 anticuerpos y/o marcadores detectables. Véase el documento WO 03/057838; US 8,455,622. Dichos grupos terapéuticos pueden ser cualquier agente que se pueda usar para tratar, combatir, mejorar, prevenir o mejorar una condición o enfermedad no deseada en un paciente, como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo posencefalítico, demencia

20 postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia de parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), demencia concuerpos de Lewy, variante de cuerpos de Lewy de la

25 enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

[0278] Los restos terapéuticos conjugados pueden incluir agentes citotóxicos, agentes citostáticos, agentes neurotróficos, agentes neuroprotectores, agentes radioterapéuticos, inmunomoduladores o cualquier agente biológicamente activo que facilite o aumente la

30 actividad del anticuerpo. Un agente citotóxico puede ser cualquier agente tóxico para una célula. Un agente citostático puede ser cualquier agente que inhiba la proliferación celular.

Un agente neurotrófico puede ser cualquier agente, incluidos los agentes químicos o proteínicos, que promueve el mantenimiento, el crecimiento o la diferenciación de las neuronas. Un agente neuroprotector puede ser un agente, incluidos los agentes químicos o proteínicos, que protege a las neuronas de lesiones agudas o procesos degenerativos. Un inmunomodulador puede ser cualquier agente que estimule o inhiba el desarrollo o mantenimiento de una respuesta inmunológica. Un agente radioterapéutico puede ser cualquier molécula o compuesto que emita radiación. Si dichos restos terapéuticos se acoplan a un anticuerpo específico de tau, como los anticuerpos descritos en el presente documento, los restos terapéuticos acoplados tendrán una afinidad específica por las células afectadas por la enfermedad relacionada con tau sobre las células normales. En consecuencia, la administración de los anticuerpos conjugados se dirige directamente a las células cancerosas con un daño mínimo en el tejido sano normal que rodea. Esto puede ser particularmente útil para los grupos terapéuticos, ya que son demasiado tóxicos para ser administrados por sí mismos. Además, se pueden usar cantidades más pequeñas de los restos terapéuticos.

[0279] Algunos de estos anticuerpos pueden modificarse para actuar como inmunotoxinas. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5,194,594. Por ejemplo, la ricina, una toxina celular derivada de plantas, se puede acoplar a los anticuerpos usando los reactivos bifuncionales S-acetilmercaptosuccínico anhídrido para el anticuerpo y succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato para ricina. Ver Pietersz et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). El acoplamiento da como resultado la pérdida de la actividad de unión a la cadena B de la ricina, mientras que no afecta ni el potencial tóxico de la cadena A de la ricina ni la actividad del anticuerpo. De manera similar, la saporina, un inhibidor del ensamblaje ribosómico, se puede acoplar a los anticuerpos a través de un enlace disulfuro entre grupos sulfhidrilo insertados químicamente. Véase Polito et al., *Leukemia* 18: 1215-1222 (2004).

[0280] Algunos de estos anticuerpos pueden unirse a los radioisótopos. Los ejemplos de radioisótopos incluyen, por ejemplo, itrio⁹⁰ (90Y), indio¹¹¹ (111In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, radioplatina-111, radioplatina-199 y Bismuto²¹³. La unión de los radioisótopos a los anticuerpos puede realizarse con quelatos bifuncionales convencionales. Para los enlaces radioplatina-111 y radioplatina-199, se pueden usar enlazadores a base de azufre. Ver Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). El enlace de los radioisótopos de plata puede implicar la reducción de la

inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para radioisótopos como ^{111}In y ^{90}Y , se puede usar o de ibritumomab y reaccionará con dichos isótopos para formar tiuxetano de ^{111}In -ibritumomab y tiuxetano de ^{90}Y -ibritumomab, respectivamente. Ver Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

[0281] Algunos de estos anticuerpos pueden unirse a otros grupos terapéuticos. Dichos restos terapéuticos pueden ser, por ejemplo, citotóxicos, citostáticos, neurotróficos o neuroprotectores. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con fármacos quimioterapéuticos tóxicos como la maitansina, la geldanamicina, los inhibidores de la tubulina, como los agentes de unión a la tubulina (por ejemplo, auristatinas), o los agentes de unión al surco menor, como la caliqueamicina. Otros grupos terapéuticos representativos incluyen agentes que se sabe que son útiles para el tratamiento, manejo o mejora de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia de Parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

[0282] Los anticuerpos también se pueden acoplar con otras proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden acoplar con finómeros. Los finómeros son pequeñas proteínas de unión (por ejemplo, 7 kDa) derivadas del dominio SH3 de Fyn humano. Pueden ser estables y solubles, y pueden carecer de residuos de cisteína y enlaces disulfuro. Los finómeros pueden diseñarse para unirse a moléculas objetivo con la misma afinidad y especificidad que los anticuerpos. Son adecuados para crear proteínas de fusión multiespecíficas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, los Finómeros pueden fusionarse a los extremos N-terminal y/o C-terminal de los anticuerpos para crear FynomAbs bi y tri-específicos con diferentes arquitecturas. Los Finómeros pueden seleccionarse utilizando bibliotecas de finómeros a través de tecnologías de detección que utilizan FACS, Biacore y ensayos basados en células que permiten una selección eficiente de Finómeros con propiedades

óptimas. Ejemplos de Finómeros se describen en Grabulovski et al., *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter et al., *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner et al., *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6): 1124-1137 (2013); y Brack et al., *Mol. Cáncer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

5 [0283] Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden acoplar o conjugar con uno o más anticuerpos diferentes (por ejemplo, para formar heteroconjugados de anticuerpos). Tales otros anticuerpos pueden unirse a diferentes epítomos dentro de tau o pueden unirse a un antígeno objetivo diferente.

10 [0284] Los anticuerpos también se pueden acoplar con una etiqueta detectable. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, 15 tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia de Parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).y/o para evaluar la eficacia del tratamiento. Dichos anticuerpos son particularmente útiles para realizar tales 20 determinaciones en sujetos que tienen o son susceptibles a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, 25 tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia de Parkinsonismo de Guam, degeneración corticobasal (CBD), variante de cuerpo de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP), o en muestras biológicas apropiadas obtenidas de dichos sujetos. Los marcadores detectables representativos que 30 pueden estar acoplados o unidos a un anticuerpo incluyen diversas enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta galactosidasa o acetilcolinesterasa;

grupos protésicos, tales como estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, como el luminol; materiales bioluminiscentes, tales como luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, como radioplatina-111, radioplatina-199, Bismuto²¹³, yodo(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbón (¹⁴C), azufre (⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tectenio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdenio (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, y ¹¹⁷Tm; metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones; iones metálicos paramagnéticos no radiactivos; y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas a radioisótopos específicos.

[0285] La unión de los radioisótopos a los anticuerpos puede realizarse con quelatos bifuncionales convencionales. Para radioplatina-111 y radioplatina-199, se pueden usar enlazadores a base de azufre. Ver Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). El enlace de los radioisótopos de plata puede implicar la reducción de la inmunoglobulina con ácido ascórbico. Para radioisótopos como ¹¹¹In y ⁹⁰Y, se puede usar tiuxetano de ibritumomab y reaccionará con dichos isótopos para formar tiuxetano de ¹¹¹In-ibritumomab y tiuxetano de ⁹⁰Y-ibritumomab, respectivamente. Ver Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1: S91-S95 (2001).

[0286] Los restos terapéuticos, otras proteínas, otros anticuerpos y/o marcadores detectables se pueden acoplar o conjugar, directa o indirectamente a través de un intermedio (por ejemplo, un enlazador), a un anticuerpo de la invención. Véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2^a Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et

al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); and Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Se pueden emplear diferentes enlazadores que liberan los restos terapéuticos, proteínas, anticuerpos y/o marcadores detectables acoplados en condiciones ácidas o reductoras, en la exposición a proteasas específicas o en otras condiciones definidas.

VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de uso

[0287] En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o una composición farmacéutica se administra a un paciente susceptible, o de lo contrario, en riesgo de una enfermedad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) en el régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En particular, el régimen es preferiblemente efectivo para inhibir o retrasar tau o fosfo-tau y filamentos pareados formados a partir de él en el cerebro, y/o inhibir o retrasar sus efectos tóxicos y/o inhibir/o retrasar el desarrollo de déficits de comportamiento. En aplicaciones terapéuticas, un anticuerpo se administra a un paciente sospechoso de o que ya padece una enfermedad (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer) en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para mejorar o al menos inhibir un mayor deterioro de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En particular, el régimen es preferiblemente efectivo para reducir o al menos inhibir un aumento adicional de los niveles de tau, fosfortau o filamentos pareados formados a partir de él, toxicidades asociadas y/o déficits de comportamiento.

[0288] Un régimen se considera terapéuticamente o profilácticamente eficaz si un paciente tratado individualmente logra un resultado más favorable que el resultado promedio en una población de control de pacientes comparables no tratados con los métodos de la invención, o si se demuestra un resultado más favorable en pacientes tratados versus pacientes control en un ensayo clínico controlado (por ejemplo, un ensayo de fase II, fase II/III o fase III) a un nivel de $p < 0.05$ o 0.01 o incluso 0.001 .

[0289] Las dosis efectivas varían dependiendo de muchos factores diferentes, como los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es portador de ApoE, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es adecuado. profiláctico o terapéutico.

[0290] Los rangos de dosis ejemplares para anticuerpos son de aproximadamente 0.01 a 60 mg/kg, o de aproximadamente 0.1 a 3 mg/kg o de 0.15-2 mg/kg o de 0.15-1.5 mg/kg, del peso corporal del paciente. El anticuerpo puede administrarse en dosis de este tipo diariamente, en días alternativos, semanales, quincenales, mensuales, trimestrales o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

[0291] Los anticuerpos se administran preferiblemente a través de una ruta periférica (es decir, uno en el que un anticuerpo administrado o inducido cruza la barrera hematoencefálica para alcanzar un sitio deseado en el cerebro). Las vías de administración incluyen tópicas, intravenosas, orales, subcutáneas, intraarteriales, intracraneales, intratecales, intraperitoneales, intranasales, intraoculares o intramusculares. Las vías preferidas para la administración de anticuerpos son intravenosas y subcutáneas. Las rutas preferidas para la inmunización activa son subcutánea e intramuscular. Este tipo de inyección se realiza generalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal.

[0292] Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas y se fabrican bajo condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una administración única). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los anticuerpos pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, la solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los

anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

[0293] Los regímenes presentes pueden administrarse en combinación con otro agente eficaz en el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, los regímenes actuales se pueden combinar con inmunoterapia contra la A β (documento WO/2000/072880), inhibidores de la colinesterasa o memantina, o en el caso de la inmunoterapia contra la enfermedad de Parkinson contra la sinucleína alfa WO/2008/103472, levodopa, agonistas de la dopamina, inhibidores de la COMT, inhibidores de la MAO-B, amantadina o agentes anticolinérgicos.

[0294] Los anticuerpos se administran en un régimen efectivo, es decir, una dosis, una vía de administración y una frecuencia de administración que retrasan la aparición, reducen la gravedad, inhiben un mayor deterioro y/o mejoran al menos un signo o síntoma de un trastorno que se está tratando. Si un paciente ya sufre de un trastorno, el régimen se puede denominar como un régimen terapéuticamente eficaz. Si el paciente tiene un riesgo elevado de padecer el trastorno en relación con la población general, pero aún no tiene síntomas, el régimen se puede denominar como un régimen profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede observar en un paciente individual en relación con los controles históricos o la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede demostrarse en un ensayo clínico o preclínico en una población de pacientes tratados en relación con una población control de pacientes no tratados.

[0295] Las dosis ejemplares para un anticuerpo son 0.1-60 mg/kg (por ejemplo, 0.5, 3, 10, 30 o 60 mg/kg), o 0.5-5 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0.5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg/kg) o 10-4000 mg o 10-1500 mg como una dosis fija. La dosis depende de la condición del paciente y de la respuesta al tratamiento anterior, si lo hay, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

[0296] La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Algunos anticuerpos pueden administrarse en la circulación sistémica mediante administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período de 30 a 90 minutos.

[0297] La frecuencia de administración depende de la vida media del anticuerpo en la circulación, el estado del paciente y la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o en intervalos irregulares en respuesta a los cambios en la condición del paciente o la progresión del trastorno que se está tratando. Una frecuencia ejemplar para la administración intravenosa es entre semanal y trimestral sobre una causa continua de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ejemplar es de diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

[0298] El número de dosis administradas depende de si el trastorno es agudo o crónico y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para los trastornos agudos o las exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, entre 1 y 10 dosis a menudo son suficientes. A veces, una dosis única de bolo, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o la exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede repetirse para la recurrencia de un trastorno agudo o exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, un anticuerpo puede administrarse a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, trimestralmente, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

A. Diagnóstico y métodos de monitoreo

Imagen *in vivo*, Métodos de diagnóstico y Optimización de la inmunoterapia

[0299] La invención proporciona métodos de depósitos de proteína tau *in vivo* (por ejemplo, enredos neurofibrilares e inclusiones de tau) en un paciente. Los métodos funcionan mediante la administración de un anticuerpo humanizado de la invención al paciente y después detectando el anticuerpo después de que se ha unido. Una respuesta de eliminación a los anticuerpos administrados se puede evitar o reducir utilizando fragmentos de anticuerpos que carezcan de una región constante de longitud completa, como los Fab. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como reactivo de diagnóstico y tratamiento.

[0300] Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse mediante inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro mediante inyección intracraneal o

perforando un agujero a través del cráneo. La dosis de reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Típicamente, el reactivo está marcado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por tau no está marcado y se usa un agente de marcaje secundario para unirse al reactivo primario. La elección de la etiqueta depende de los medios de detección. Por ejemplo, una etiqueta fluorescente es adecuada para la detección óptica. El uso de etiquetas paramagnéticas es adecuado para la detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las etiquetas radioactivas también pueden detectarse mediante tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

[0301] Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* de los depósitos de proteína tau son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de una tauopatía, como la enfermedad de Alzheimer, la degeneración lobar frontotemporal, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Pick, o la susceptibilidad a tal enfermedad. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene enredos neurofibrilares anormales, entonces es probable que el paciente sufra la enfermedad de Alzheimer. Alternativamente, si el paciente tiene inclusiones tau anormales, entonces, dependiendo de la ubicación de las inclusiones, el paciente puede sufrir degeneración lobular frontotemporal. Los métodos también se pueden utilizar en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos anormales de proteína tau indica susceptibilidad a futuras enfermedades sintomáticas. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido diagnosticados previamente con una enfermedad relacionada con la tau.

[0302] El diagnóstico se puede realizar comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los puntos etiquetados con los valores de referencia correspondientes. Los valores de la línea de base pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores basales también pueden representar niveles previos determinados en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores iniciales pueden determinarse en un paciente antes de comenzar el tratamiento de inmunoterapia tau, y los valores medidos en comparación con los valores iniciales. Una disminución en los valores en relación con la línea de base señala una respuesta positiva al tratamiento.

[0303] En algunos pacientes, el diagnóstico de una tauopatía se puede ayudar al realizar una exploración PET. Se puede realizar una exploración PET utilizando, por ejemplo, un reproductor de imágenes PET convencional y un equipo auxiliar. En general, la exploración incluye una o más regiones del cerebro que, en general, se sabe que están asociadas con depósitos de proteína tau y una o más regiones en las que, por lo general, hay pocos depósitos, si es que hay alguno, que sirvan como controles.

[0304] La señal detectada en una exploración PET puede representarse como una imagen multidimensional. La imagen multidimensional puede estar en dos dimensiones que representan una sección transversal a través del cerebro, en tres dimensiones, que representan el cerebro tridimensional, o en cuatro dimensiones que representan cambios en el cerebro tridimensional a lo largo del tiempo. Se puede usar una escala de colores con diferentes colores que indican diferentes cantidades de etiqueta y, inferencialmente, se detectó el depósito de proteína tau. Los resultados de la exploración también pueden presentarse numéricamente, con números relacionados con la cantidad de etiqueta detectada y, en consecuencia, la cantidad de depósitos de proteína tau. La etiqueta presente en una región del cerebro conocida por estar asociada con depósitos para una tauopatía particular (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer) puede compararse con la etiqueta presente en una región que se sabe que no está asociada con depósitos para proporcionar una relación indicativa del grado de depósitos en la antigua región. Para el mismo ligando radiomarcado, tales proporciones proporcionan una medida comparable de los depósitos de proteína tau y sus cambios entre diferentes pacientes.

[0305] En algunos métodos, una exploración PET se realiza al mismo tiempo o en la misma visita del paciente que una exploración IRM o TAC. Una IRM o TAC proporciona más detalles anatómicos del cerebro que una PET. Sin embargo, la imagen de una exploración PET se puede superponer en una imagen de IRM o imagen de TAC que indica con mayor precisión la ubicación del ligando PET y depósitos inferenciales de tau en relación con las estructuras anatómicas en el cerebro. Algunas máquinas pueden realizar tanto la exploración PET como la exploración IRM o TAC sin que el paciente cambie de posición entre las exploraciones, lo que facilita la superposición de imágenes.

[0306] Los ligandos de PET adecuados incluyen anticuerpos radiomarcados de la invención (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de ratón, humanizado, quimérico o revestido). El

radioisótopo utilizado puede ser, por ejemplo, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} o I^{123} . El intervalo entre la administración del ligando PET y la modalidad de la exploración puede depender del ligando PET y, en particular, de su tasa de captación y eliminación en el cerebro, y la vida media de su radiomarcador.

[0307] Las tomografías PET también se pueden realizar como una medida profiláctica en pacientes asintomáticos o en pacientes que tienen síntomas de deterioro cognitivo leve pero que aún no han sido diagnosticados con una tauopatía pero tienen un riesgo elevado de desarrollar una tauopatía. Para los pacientes asintomáticos, las exploraciones son particularmente útiles para personas consideradas con riesgo elevado de tauopatía debido a antecedentes familiares, factores de riesgo genéticos o bioquímicos o edad madura. Las exploraciones profilácticas pueden comenzar, por ejemplo, a una edad del paciente entre 45 y 75 años. En algunos pacientes, se realiza una primera exploración a los 50 años.

[0308] Las exploraciones profilácticas se pueden realizar a intervalos de, por ejemplo, entre seis meses y diez años, preferiblemente entre 1 y 5 años. En algunos pacientes, las exploraciones profilácticas se realizan anualmente. Si una exploración PET realizada como una medida profiláctica indica niveles anormalmente altos de depósitos de proteína tau, se puede iniciar la inmunoterapia y realizar una exploración PET posterior como en pacientes diagnosticados con una tauopatía. Si un PET escaneado realizado como una medida profiláctica indica niveles de depósitos de proteína tau dentro de niveles normales, se pueden realizar otros PET a intervalos de entre seis meses y 10 años, y preferiblemente de 1 a 5 años, como antes, o en respuesta a la aparición de Signos y síntomas de una tauopatía o deterioro cognitivo leve. Al combinar las exploraciones profilácticas con la administración de inmunoterapia dirigida a tau si, cuando se detecta un nivel de depósitos de proteína tau por encima de lo normal, los niveles de depósitos de proteína tau pueden reducirse, o acercarse a, los niveles normales, o al menos impedir que sigan aumentando, y el paciente puede permanecer libre de tauopatía durante un período más prolongado que si no recibiera exploraciones profilácticas e inmunoterapia dirigida a tau (por ejemplo, al menos 5, 10, 15 o 20 años, o por El resto de la vida del paciente).

[0309] Los niveles normales de depósitos de proteína tau pueden determinarse por la cantidad de enredos neurofibrilares o inclusiones de tau en los cerebros de una muestra representativa de individuos en la población general que no han sido diagnosticados con

una tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) y no se consideran con un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad (p. ej., una muestra representativa de individuos sin enfermedad menores de 50 años de edad). Alternativamente, se puede reconocer un nivel normal en un paciente individual si la señal de PET según los métodos presentes en una región del cerebro en la que se sabe que se desarrollan depósitos de proteína tau no es diferente (dentro de la precisión de la medición) de la señal de una región del cerebro en la que se sabe que tales depósitos normalmente no se desarrollan. Se puede reconocer un nivel elevado en un individuo por comparación con los niveles normales (por ejemplo, media exterior y varianza de una desviación estándar) o simplemente por una señal elevada más allá del error experimental en una región del cerebro asociada con depósitos de proteína tau en comparación con una Región no conocida por estar asociada con depósitos. Con el fin de comparar los niveles de depósitos de proteína tau en un individuo y población, los depósitos de proteína tau deben determinarse preferiblemente en la misma región (s) del cerebro, estas regiones incluyen al menos una región en la que los depósitos de proteína tau asociados con un se sabe que se forman tauopatías particulares (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer). Un paciente que tenga un nivel elevado de depósitos de proteína tau es un candidato para comenzar la inmunoterapia.

[0310] Después de comenzar la inmunoterapia, una disminución en el nivel de los depósitos de proteína tau puede verse primero como una indicación de que el tratamiento está teniendo el efecto deseado. La disminución observada puede estar, por ejemplo, en el rango de 1-100%, 1-50% o 1-25% del valor de referencia. Dichos efectos pueden medirse en una o más regiones del cerebro en las que se sabe que se forman depósitos o se pueden medir a partir de un promedio de dichas regiones. El efecto total del tratamiento se puede aproximar agregando el porcentaje de reducción en relación con la línea de base al aumento en los depósitos de proteína tau que de otra manera ocurrirían en un paciente promedio sin tratamiento.

[0311] El mantenimiento de los depósitos de proteína tau en un nivel aproximadamente constante o incluso un pequeño aumento en los depósitos de proteína tau también puede ser un indicio de respuesta al tratamiento, aunque sea una respuesta subóptima. Dichas respuestas pueden compararse con un curso temporal de los niveles de depósitos de proteína en pacientes con una tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer)

que no recibieron tratamiento, para determinar si la inmunoterapia está teniendo un efecto en la inhibición de aumentos adicionales de los depósitos de proteína tau.

[0312] El monitoreo de los cambios en los depósitos de proteína tau permite el ajuste de la inmunoterapia u otro régimen de tratamiento en respuesta al tratamiento. El monitoreo de PET proporciona una indicación de la naturaleza y el alcance de la respuesta al tratamiento. Luego se puede determinar si se debe ajustar el tratamiento y, si se desea, se puede ajustar el tratamiento en respuesta a la monitorización PET. Por lo tanto, la monitorización con PET permite que la inmunoterapia dirigida por tau u otro régimen de tratamiento se ajuste antes de que otros biomarcadores, IRM o medidas cognitivas hayan respondido de manera detectable. Un cambio significativo significa que la comparación del valor de un parámetro después del tratamiento en relación con el sótano proporciona alguna evidencia de que el tratamiento ha tenido o no un efecto beneficioso. En algunos casos, un cambio de valores de un parámetro en un paciente en sí mismo proporciona evidencia de que el tratamiento ha tenido o no un efecto beneficioso. En otros casos, el cambio de valores, si los hay, en un paciente, se compara con el cambio de valores, si los hay, en una población de control representativa de pacientes que no reciben inmunoterapia. Una diferencia en la respuesta en un paciente particular de la respuesta normal en el paciente de control (por ejemplo, media más la varianza de una desviación estándar) también puede proporcionar evidencia de que un régimen de inmunoterapia está logrando o no un efecto beneficioso en un paciente.

[0313] En algunos pacientes, el monitoreo indica una disminución detectable en los depósitos de proteína tau, pero el nivel de depósitos de proteína tau permanece por encima de lo normal. En tales pacientes, si no hay efectos secundarios inaceptables, el régimen de tratamiento puede continuarse tal como está o incluso aumentarse en la frecuencia de administración y/o dosis si no se encuentra en la dosis máxima recomendada.

[0314] Si el monitoreo indica que los niveles de depósitos de proteína tau en un paciente ya se han reducido a niveles normales o casi normales de depósitos de proteína tau, el régimen de inmunoterapia puede ajustarse desde uno de inducción (es decir, que reduce el nivel de depósitos de proteína tau) a uno de mantenimiento (es decir, que mantiene los depósitos de proteína tau en un nivel aproximadamente constante). Dicho régimen puede verse afectado por la reducción de la dosis y/o la frecuencia de administración de la inmunoterapia.

[0315] En otros pacientes, el monitoreo puede indicar que la inmunoterapia está teniendo algún efecto beneficioso pero un efecto subóptimo. Un efecto óptimo se puede definir como una reducción porcentual en el nivel de depósitos de proteína tau dentro de la mitad superior o cuartil del cambio en los depósitos de proteína tau (medidos o calculados sobre todo el cerebro o región(es) representativa(s) del mismo) en la que depósitos de proteína tau se sabe que se forman) experimentados por una muestra representativa de pacientes con tauopatía sometidos a inmunoterapia en un momento dado después de comenzar la terapia. Un paciente que experimenta una disminución menor o un paciente cuyos depósitos de proteína tau permanece constante o incluso aumenta, pero en menor medida de lo esperado en ausencia de inmunoterapia (p. Ej., Como se deduce de un grupo de control de pacientes que no recibieron inmunoterapia) se puede clasificar como que experimenta una respuesta positiva pero subóptima. Dichos pacientes pueden estar sujetos opcionalmente a un ajuste de régimen en el que aumenta la dosis y la frecuencia de administración de un agente.

[0316] En algunos pacientes, los depósitos de proteína tau pueden aumentar de manera similar o mayor a los depósitos de tau en pacientes que no reciben inmunoterapia. Si tales aumentos persisten durante un período de tiempo, como 18 meses o 2 años, incluso después de cualquier aumento en la frecuencia o dosis de los agentes, la inmunoterapia puede, si se desea, interrumpirse en favor de otros tratamientos.

[0317] La descripción anterior del diagnóstico, monitoreo y ajuste del tratamiento para las tauopatías se ha centrado en gran medida en el uso de tomografías PET. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otra técnica para visualizar y/o medir los depósitos de proteína tau que son susceptibles al uso de los anticuerpos tau de la invención (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de ratón, humanizado, quimérico o revestido) en lugar de las exploraciones de PET para realizar tales métodos

[0318] También se proporcionan métodos para detectar una respuesta inmune contra tau en un paciente que sufre o es susceptible a enfermedades asociadas con tau. Los métodos pueden usarse para monitorear un curso de tratamiento terapéutico y profiláctico con los agentes proporcionados en este documento. El perfil de anticuerpos después de la inmunización pasiva típicamente muestra un pico inmediato en la concentración de anticuerpos seguido de un decaimiento exponencial. Sin una dosis adicional, la desintegración se aproxima a los niveles de pretratamiento en un período de días a meses,

dependiendo de la vida media del anticuerpo administrado. Por ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

[0319] En algunos métodos, se realiza una medición de referencia del anticuerpo a tau en el sujeto antes de la administración, una segunda medición se realiza poco después para determinar el nivel máximo de anticuerpos y uno o más Se realizan mediciones adicionales a intervalos para controlar el deterioro de los niveles de anticuerpos. Cuando el nivel de anticuerpo ha disminuido a la línea base o un porcentaje predeterminado del pico menos la línea de base (por ejemplo, 50%, 25% o 10%), se administra la administración de una dosis adicional de anticuerpo. En algunos métodos, los niveles máximos o subsiguientes medidos menos los antecedentes se comparan con los niveles de referencia previamente determinados para constituir un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico beneficioso en otros sujetos. Si el nivel de anticuerpos medido es significativamente menor que un nivel de referencia (por ejemplo, menos de la media menos uno o, preferiblemente, dos desviaciones estándar del valor de referencia en una población de sujetos que se benefician del tratamiento), se indica la administración de una dosis adicional de anticuerpo.

[0320] También se proporcionan métodos para detectar tau en un sujeto, por ejemplo, midiendo tau en una muestra de un sujeto o mediante imágenes *in vivo* de tau en un sujeto. Tales métodos son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de enfermedades asociadas con tau, o susceptibilidad a ellas. Los métodos también se pueden utilizar en sujetos asintomáticos. La presencia de tau indica susceptibilidad a futuras enfermedades sintomáticas. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en sujetos que han sido diagnosticados previamente con enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

[0321] Las muestras biológicas obtenidas de un sujeto con sospecha de tener o con riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP) se pueden contactar con los anticuerpos descritos en el presente documento para evaluar la presencia de tau. Por ejemplo, los niveles de tau en tales sujetos pueden compararse con los presentes en sujetos sanos. Alternativamente, los niveles de tau en los sujetos que reciben tratamiento para la enfermedad pueden compararse con los de los sujetos que no han recibido tratamiento para la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP). Algunas de estas pruebas implican una biopsia de tejido obtenido de dichos sujetos. Los ensayos ELISA también pueden ser métodos útiles, por ejemplo, para evaluar tau en muestras de fluidos.

VII. Kits

[0322] La invención proporciona además kits (por ejemplo, contenedores) que comprenden un anticuerpo descrito en el presente documento y materiales relacionados, tales como instrucciones de uso (por ejemplo, prospecto). Las instrucciones de uso pueden contener, por ejemplo, instrucciones para la administración del anticuerpo y opcionalmente uno o más

agentes adicionales. Los contenedores de anticuerpos pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de dosis múltiples), o dosis de subunidades.

[0323] El prospecto se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosis, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

[0324] Los kits también pueden incluir un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

VIII. Otras Aplicaciones

[0325] Los anticuerpos pueden usarse para detectar tau, o fragmentos de los mismos, en el contexto de diagnóstico clínico o tratamiento o en investigación. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de tau en una muestra biológica como una indicación de que la muestra biológica comprende depósitos de tau. La unión de los anticuerpos a la muestra biológica se puede comparar con la unión de los anticuerpos a una muestra de control. La muestra de control y la muestra biológica pueden comprender células del mismo origen de tejido. Las muestras de control y las muestras biológicas se pueden obtener del mismo individuo o de individuos diferentes y en la misma ocasión o en ocasiones diferentes. Si se desea, múltiples muestras biológicas y múltiples muestras de control se evalúan en múltiples ocasiones para protegerlas contra la variación aleatoria independientemente de las diferencias entre las muestras. Luego se puede hacer una comparación directa entre la(s) muestra(s) biológica(s) y la(s) muestra(s) de control para determinar si la unión del anticuerpo (es decir, la presencia de tau a la(s) muestra(s) biológica(s) aumenta, disminuye, o es igual a la unión del anticuerpo a la(s) muestra(s) de control. El aumento de la unión del anticuerpo a la(s) muestra(s) biológica(s) en relación con la(s) muestra(s) de control indica la presencia de tau en la(s) muestra(s) biológica(s). En algunos casos, el aumento de la unión del anticuerpo es estadísticamente significativo. Opcionalmente, la unión del anticuerpo a la muestra biológica es al menos 1.5 veces, 2

veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, o 100 veces más alta que la unión del anticuerpo al control muestra.

[0326] Además, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de tau en una muestra biológica para monitorear y evaluar la eficacia de un agente terapéutico que se usa para tratar a un paciente diagnosticado con enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP). Una muestra biológica de un paciente con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP) se evalúa para establecer una línea de base para la unión de los anticuerpos a la muestra (es decir, una línea de base para la presencia de tau en la muestra) antes de comenzar la terapia con el agente terapéutico. En algunos casos, se evalúan múltiples muestras biológicas del paciente en múltiples ocasiones para establecer tanto una línea de base como una medida de variación aleatoria independiente del tratamiento. Luego se administra un agente terapéutico en un régimen. El régimen puede incluir múltiples administraciones del agente durante un período de tiempo. Opcionalmente, la unión de los anticuerpos (es decir, la presencia de tau) se evalúa en múltiples ocasiones en múltiples muestras biológicas del paciente, tanto para establecer una medida de variación aleatoria como para mostrar una tendencia en respuesta a la inmunoterapia.

Luego se comparan las diversas evaluaciones de la unión del anticuerpo a las muestras biológicas. Si solo se realizan dos evaluaciones, se puede hacer una comparación directa entre las dos evaluaciones para determinar si la unión del anticuerpo (es decir, la presencia de tau) ha aumentado, disminuido o se mantuvo igual entre las dos evaluaciones. Si se

5 realizan más de dos mediciones, las mediciones se pueden analizar como un curso de tiempo que comienza antes del tratamiento con el agente terapéutico y continúa durante el curso de la terapia. En pacientes en los que la unión de anticuerpos a muestras biológicas ha disminuido (es decir, la presencia de tau), se puede concluir que el agente terapéutico fue eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro

10 cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal

15 (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP). La disminución en la unión del anticuerpo puede ser estadísticamente significativa. Opcionalmente, la unión disminuye al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 %, o 100%. La

20 evaluación de la unión del anticuerpo se puede realizar junto con la evaluación de otros signos y síntomas de la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal,

25 enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia por parkinsonismo de Guam, demencia corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewys, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

30 [0327] Los anticuerpos también pueden usarse como reactivos de investigación para investigación de laboratorio en la detección de tau, o fragmentos de los mismos. En tales

usos, los anticuerpos pueden marcarse con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por hilado, enzimas o radioisótopos, y pueden proporcionarse en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de detección. Los anticuerpos también se pueden usar para purificar tau, o parejas de unión de tau, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

[0328] Todas las solicitudes de patente, sitios web, otras publicaciones, números de acceso y similares citados anteriormente o más abajo se incorporan por referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si cada artículo individual se indicara específica e individualmente como tal. Si se asocian diferentes versiones de una secuencia con un número de acceso en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de acceso en la fecha efectiva de presentación de esta solicitud. La fecha de presentación efectiva se refiere a la fecha de presentación real o anterior a la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de acceso, si corresponde. Del mismo modo, si se publican diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares en diferentes momentos, la versión más reciente publicada en la fecha de presentación efectiva de la solicitud se entiende a menos que se indique lo contrario. Cualquier característica, paso, elemento, modalidad o aspecto de la invención puede usarse en combinación con cualquier otro a menos que se indique específicamente lo contrario. Aunque la presente invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, será evidente que ciertos cambios y modificaciones pueden ponerse en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Identificación de Anticuerpos Monoclonales de tau

[0329] Los anticuerpos monoclonales contra tau se generaron de la siguiente manera. Las inmunizaciones se realizaron con cualquiera de tau humana 383 a.a. marcada con His de N-terminal (4R0N), que contiene una mutación P301S [inmunógeno A] o tau humana 383 a.a. recombinante (4R0N) que contiene una mutación P301S, que carece de una marca His de N-terminal [inmunógeno B]. Los inmunógenos se emulsionaron en adyuvante RIBI.

[0330] Ratones Balb/c hembra de cinco semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal con 25 µg de inmunógeno A en el día 0 y 10 µg de inmunógeno A cada uno

en los días 7, 14, 21, 27, 34, 48, 55 y 62. Los ratones se inmunizaron con 10 µg de inmunógeno B en los días 76 y 90. En los días 43 y 98, los ratones se sangraron y se titularon frente al inmunógeno A; en el día 101, los animales con títulos más altos se reforzaron con una inmunización terminal de 50 µg de inmunógeno B, que se administró por vía intraperitoneal e intravenosa. Los hibridomas fusionados se seleccionaron mediante ELISA frente a ambos inmunógenos, y los positivos con la señal más alta se mapearon en epítomos (ver Ejemplo 2).

Ejemplo 2. Mapeo de epítomos del anticuerpo 3D6

[0331] Se usó un rango de péptidos biotinilados superpuestos que abarcan toda la proteína tau humana 383aa 4R0N para mapear el anticuerpo 3D6 murino. Se usaron péptidos adicionales para modelar posibles modificaciones postraduccionales de los extremos C y N terminales de la proteína.

[0332] Los péptidos biotinilados se unieron a pocillos separados de una placa ELISA recubierta con estreptavidina. La placa se bloqueó y se trató con 3D6 murino, seguido de incubación con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después de un lavado minucioso, se aplicó OPD a la placa y se dejó desarrollar. La placa se leyó a una absorbancia de 450 nm. La sustracción de fondo se realizó con valores de absorbancia de pocillos que no contenían anticuerpos primarios, y se estableció un umbral para la unión positiva a 0.2 unidades de absorbancia. La unión se mapeó a sitios dentro de la región MTBR.

Ejemplo 3. Diseño de anticuerpos 3D6 humanizados

[0333] El punto de partida o anticuerpo donante para la humanización fue el anticuerpo 3D6 de ratón. La secuencia de aminoácidos variables de cadena pesada de m3D6 maduro se proporciona como SEQ ID NO: 7. La secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera de m3D6 maduro se proporciona como SEQ ID NO: 11. Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada del Compuesto de Kabat/Chothia CDR1, CDR2 y CDR3 se proporcionan como SEQ ID NOs: 8-10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera de Kabat CDR1, CDR2 y CDR3 se proporcionan como SEQ ID NOs 12-14 respectivamente. La numeración de Kabat se utiliza en todas partes.

[0334] La variable kappa (Vk) de 3D6 pertenece al subgrupo 2 de Kabat del ratón que corresponde al subgrupo 2 de Kabat humano y la variable pesada (Vh) al subgrupo 2c de Kabat del ratón que corresponde al subgrupo 1 de Kabat humano [Kabat E.A., et al., (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición. Publicación de NIH No. 91-3242]. El residuo 16 de Chothia CDR-L1 pertenece a la clase canónica 4, el residuo 7 de Chothia CDR-L2 a la clase 1, el residuo 9 de Chothia CDR-L3 a la clase 1 en Vk [Martin A.C, y Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800-15. [Martin & Thornton, 1996]. El residuo 10 de Chothia CDR-H1 pertenece a la clase 1, el residuo 17 de Chothia CDR-H2 a la clase 2 [Martin & Thornton, 1996]]. CDR-H3 no tiene clases canónicas. Se realizó una búsqueda sobre las secuencias de proteínas en la base de datos PDB [Deshpande N, et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7.] para encontrar estructuras que proporcionarían un moedlo estructural aproximado de 3D6. Para crear un modelo de Fv de 3D6, se utilizó una estructura de anti-piroglutamato murino-anticuerpo Abeta Fab c#24 (código pdb 5MYX) [Piechotta, A. et., al., 2017, *J Biol. Chem.* 292:12713-12724] con una resolución de 1.4 Å. Retuvo la misma estructura canónica para los bucles que 3D6.

[0335] Los marcos de 3D6 VH comparten un alto grado de similitud de secuencia con las regiones correspondientes de 48G7 Fab PDB humanizado:2RCS, diseñado por Wedemayer, G. J., et al. (1997; *Science* 276: 1665-1669). Los dominios variables de 3D6 y 48G7 fab también comparten longitudes idénticas para los bucles de CDR-H1, H2. De manera similar, los marcos de 3D6 VL comparten un alto grado de similitud de secuencia con las regiones correspondientes del anticuerpo humano ARX71335 VL, clonado por Dafferner, A. J., et al. (2017; Envío directo). El dominio variable ligero del anticuerpo 3D6 y ARX71335 también comparte longitudes idénticas para los bucles CDR-L1, L2 y L3. Por consiguiente, las regiones marco de 48G7 VH (2RCS-VH) y ARX71335 VL se eligieron como secuenciasceptoras para las CDR de 3D6. Se construyó un modelo de las CDR de 3D6 injertados en los respectivos marcos humanos para VH y VL y se utilizó como guía para posteriores retro-mutaciones.

[0336] Las secuencias de las variantes de cadena pesada y ligera resultantes del proceso de humanización del anticuerpo se alinearon aún más con las secuencias de la línea germinal humana utilizando la herramienta IMGT Domain GapAlign para evaluar la humanidad de la cadena pesada y ligera según se describe en las directrices del comité INN

de la OMS. (*WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)* (Internet) 2014. Disponible en: <http://www.Who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>). Los residuos fueron cambiados para alinearse con la secuencia de la línea germinal humana correspondiente, donde sea posible, para mejorar la humanidad y para reducir la inmunogenicidad potencial. Para las variantes humanizadas de VLvb2 y VLvb3, se introdujeron mutaciones para hacer las secuencias más similares al gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) Para las variantes humanizadas de VHvb2, VHvb3, VHvb4, VHvb5, VHvb6 y VHvb6, se introdujeron mutaciones para hacer las secuencias más similares al gen de la línea germinal humana IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25).

[0337] Las versiones de hu3D6-VH y hu3D6-VL se diseñaron para permitir la evaluación de varios residuos de marco por sus contribuciones a la unión de antígenos, termoestabilidad e inmunogenicidad, y para la optimización de glicosilación, agregación, heterogeneidad de N-terminal, termoestabilidad, parches cargados expuestos en la superficie, parches de carga expuestos en la superficie, desaminación y susceptibilidad a las proteinasas. Las posiciones consideradas para la mutación incluyen aquellas que ...

- definen las conformaciones de CDR canónicas (resumidas en Martin, A.C.R. (2010) *Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains*. En: Kontermann R y Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Alemania: Springer International Publishing AG.)
- están dentro de la zona de Vernier (Foote J y Winter G. (1992) *Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops*. *J Mol Biol.* 224(2):487-99.),
- localizar en la interfaz del dominio VH/VL (resumido en Léger OJP y Saldanha J. (2000) *Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanisation by CDR grafting*. En: Shepherd P y Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.),
- son susceptibles a modificaciones postraduccionales, como glicosilación o piroglutaminación,

- están ocupadas por residuos que se prevé que choquen con los CDR, según el modelo de CDR de 3D6 injertados en los marcos VH y VL, o
- están ocupadas por residuos que son raros entre los anticuerpos humanos secuenciados, donde el residuo 3D6 de ratón parental o algún otro residuo es mucho más frecuente dentro del repertorio de anticuerpos humanos.

[0338] Se muestran alineaciones del 3D6 murino y varios anticuerpos humanizados para las regiones variables de cadena ligera (Tabla 4 y Figura 2) y regiones variables de cadena pesada (Tabla 3 y Figura 1).

[0339] Se construyeron 7 variantes de la región variable de cadena pesada humanizada y 3 variantes de la región variable de cadena ligera humanizada que contenían diferentes permutaciones de sustituciones: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6Hvb5, hu3D6VHvb6 o hu3D6Hvb7 (SEQ ID NOs: 76-80 y 90-91, respectivamente); y hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 o hu3D6VLvb3 (SEQ ID NOs: 83-85, respectivamente) (Tablas 3 y 4). Los diseños de Vk y Vh humanizados ejemplares, con retro-mutaciones y otras mutaciones basadas en marcos humanos seleccionados, se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Las áreas en negrita en las Tablas 3 y 4 indican los CDR definidos por el Compuesto de Kabat/Chothia. SEQ ID NO: 76-80 y SEQ ID NO: 90-91 contienen retro-mutaciones y otras mutaciones como se muestra en la Tabla 5. Los aminoácidos en posiciones en hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7 se enumeran en la Tabla 6. Los aminoácidos en las posiciones hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3 se enumeran en la Tabla 7. El porcentaje de humanidad para las cadenas VH humanizadas hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7 (SEQ ID NOs: 76-80 y 90-91, respectivamente) y las cadenas VL humanizadas hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 83-85, respectivamente) se muestran en la Tabla 8.

10

15

20

25

30

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VH de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFvbk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	T	T	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I	I	I	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K	K	K	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	L	M	M	L	L	L	L	L	L	L
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
35B		CDR-H1	-		-	-	-	-	-	-	-	-
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q	K	K	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	R	R	R	R	R	R	R

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VH de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFvbk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L	R	W	W	W	W	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	V	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52C		CDR-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	54	CDR-H2	E	E	A	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
55	56	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2	D	E	N	D	D	D	D	E	E	E
57	58	CDR-H2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	V	I	K	V	V	I	I	I	V	V

15202530

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VH de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:7)	IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	2RCS-VH_huFrvk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
80	81	Fr3	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
81	82	Fr3	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	F	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	S	A	A	S	S	S	S	S	S	S
94	98	Fr3	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T
95	99	CDR-H3	L		Y	L	L	L	L	L	L	L
96		CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-
97		CDR-H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-

15202530

10

15

20

25

Tabla 4

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	T	S	T	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	T	S	T	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	P	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	I	L	I	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLyb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLyb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLyb3 (SEQ ID NO:85)
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	K	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	V	L	L	L
27D	31	CDR-L1	D	Y	H	D	D	D
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27F		CDR-L1	-					
28	33	CDR-L1	D	N	D	D	D	D
29	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
30	35	CDR-L1	K	K	N	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T	T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
34	39	CDR-L1	N	N	N	N	N	N
35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	41	Fr2	L	L	F	L	L	L
37	42	Fr2	L	L	Q	L	L	Q
38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	50	Fr2	K	K	R	K	K	R
46	51	Fr2	R	R	R	R	R	R
47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	L	K	L	L	L
51	56	CDR-L2	V	V	V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	K	N	K	K	K
54	59	CDR-L2	L	L	R	L	L	L
55	60	CDR-L2	D	D	D	D	D	D
56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D	D	D	D	D
61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	68	Fr3	T	S	S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D	D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	79	Fr3	K	K	K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	88	Fr3	L	L	V	L	V	V
84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	H	Y	H	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	94	CDR-L3	W	E	M	W	W	W

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	G	G	G	G	G	G
92	97	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
93	98	CDR-L3	H	H	H	H	H	H
94	99	CDR-L3	F	F	W	F	F	F
95	100	CDR-L3	P	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95B		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95C		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95D		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95E		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
95F		CDR-L3	-	-	-	-	-	-
96	101	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y	Y
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	A	Q	A	A	Q
101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	L	I	L	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	VL de 3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)	ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82)	IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)
107	113	Fr4	R			R	R	R

[0340] **Tabla 5: Retro-mutaciones de V_H, V_L y Otras Mutaciones para 3D6 Humanizado**

V _H o V _L Variante	V _H o V _L Secuencia Aceptora de Exón	Cambios de Residuos del Marco Aceptor (o CDR) (con base en los CDRs del Compuesto de Kabat/Chothia)
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H91, H93, H94
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H67, H75, H76, H81, H91, H93, H94
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91, H93, H94, H108, H109
Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)	PDB ID 2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75) IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108, H109
Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	
Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	L7, L10, L15, L83, L86, L106
Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	PDB ID ARX71335-VL_huFrwk (SEQ ID NO:82); IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)	L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100, L106

[0341] **Tabla 6: Numeración de Kabat de los Residuos del Marco (o CDR) (con base en los CDR del Compuesto de Kabat/Chothia) para Retro-Mutaciones y Otras Mutaciones en Cadenas Pesadas de Anticuerpos Humanizados 3D6**

Residuo	2RCS-VH_huFrwk (SEQ ID NO:75)	(Cadena Pesada)IMGT#IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25)	3D6 de Ratón (SEQ ID NO:7)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6 VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)
H1	Q	E	E	Q	E	E	E	E	E	E
H5	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	V	V
H11	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V
H17	S	T	L	S	S	T	T	T	T	T
H20	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I
H23	T	K	K	T	K	K	K	K	K	K
H28	N	T	N	N	N	N	T	T	T	T
H38	K	Q	R	K	R	R	R	R	R	R
H42	E	G	E	E	G	G	G	G	G	G
H43	Q	K	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H54	N	D	N	N	N	N	N	D	D	D
H56	N	E	D	D	D	D	D	E	E	E
H58	K	I	V	V	V	I	I	I	V	V
H66	K	R	K	K	R	R	R	R	R	R
H67	A	V	A	A	A	A	V	V	V	V
H75	S	T	S	S	T	T	T	T	T	T
H76	N	D	N	N	D	D	D	D	D	D
H80	L	M	L	L	L	M	M	M	M	M
H81	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E
H83	T	R	T	T	T	R	R	R	R	R
H91	Y	Y	F	F	F	Y	Y	Y	F	Y
H93	A	A	S	S	S	S	S	S	S	S
H94	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H108	T	L	T	T	L	L	L	L	L	L
H109	L	V	L	L	V	V	V	V	V	V

[0342] **Tabla 7: Numeración de Kabat de los Residuos del Marco (con base en los CDR del Compuesto de Kabat/Chothia) para Retro-Mutaciones y Otras Mutaciones en Cadenas Ligeras de Anticuerpos Humanizados 3D6**

<u>Residuo</u>	<u>ARX71335-VL huFwk (SEQ ID NO:82)</u>	<u>(Cadena Ligera) IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27)</u>	<u>3D6 de Ratón (SEQ ID NO:11)</u>	<u>Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)</u>	<u>Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)</u>	<u>Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)</u>
L7	T	S	T	T	S	S
L10	T	S	T	T	S	S
L15	I	L	I	I	L	L
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E
L24	K	R	K	K	K	R
L37	L	Q	L	L	L	Q
L45	K	R	K	K	K	R
L83	L	V	L	L	V	V
L86	H	Y	Y	H	Y	Y
L100	A	Q	G	A	A	Q
L106	L	I	I	L	I	I

[0343] **Tabla 8: Porcentaje de Humanidad de Cadenas Pesada y Ligera de Anticuerpos Humanizados 3D6**

V _H o V _L Variante	% de Humanidad
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	65.3%
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	76.5%
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	81.6%
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	83.7%
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	85.7%
Hu3D6 VHvb6 (SEQ ID NO:90)	83.7%
Hu3D6 VHvb7 (SEQ ID NO:91)	84.7%
Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	82.0%
Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	87.0%
Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	89.0%

[0344] Las posiciones en las que los residuos canónicos, de vernier o de interfaz difieren entre las secuencias aceptoras de ratón y humanas son candidatas para sustitución. Los ejemplos de residuos canónicos/CDR que interactúan incluyen los residuos H54 y H94 de Kabat en la Tabla 3. Los ejemplos de residuos de vernier incluyen los residuos H28, H67, H93 y H94 de Kabat en la Tabla 3. Los ejemplos de residuos de interfaz/empaquetamiento (VH + VL) incluyen residuos H91 y H93 de Kabat en la Tabla 3.

[0345] Los fundamentos para la selección de las posiciones indicadas en la Tabla 3 en la región variable de cadena pesada como candidatos para la sustitución son los siguientes.

[0346] *Regiones variables de cadena pesada*

[0347] *hu3D6VHvb1*

- consiste en los bucles CDR-H1, H2 y H3 de 3D6-VH injertados en el marco de 48G7-VH (RCS-VH), con retro-mutaciones en las posiciones H91 (Y91F), H93 (A93S) y H94 (S94T) .

[0348] hu3D6VHvb2

- 5
- revierte todas las sustituciones de marco en posiciones que son clave para definir las clases canónicas de Chothia, son parte de la zona de vernier, o se localizan en la interfaz de dominio VH/VL o contribuyen a la estabilidad estructural. 3D6-VH_vb2 incorpora retro-mutaciones o sustituciones Q1E, Q5V, L11V, L20I, T23K, K38R, E42G, Q43K, K66R, S75T, N76D, Q81E,

10

Y91F, A93S, S94T T108L, y L109V, para permitir la evaluación de las contribuciones de estas posiciones a la afinidad de unión a antígeno e inmunogenicidad.

[0349] hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7

- 15
- consiste en sustituciones adicionales y se añaden a la estabilidad del anticuerpo y/o para la optimización de la glicosilación, agregación, heterogeneidad del N-terminal, termoestabilidad, parches cargados expuestos en la superficie, parches con carga expuestos en la superficie, desaminación y susceptibilidad a proteinasas.

20

[0350] Q1E: es una mutación potenciadora de la estabilidad para mitigar el potencial de formación de piroglutamato (Liu, supra). Q1E es una mutación inversa.

[0351] Q5V: es una mutación de alineación de línea germinal basada en la frecuencia. Val es más frecuente en secuencias humanas en esta posición. Val está en el gen IMGT No. IGHV1-69-2*01 de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

25

[0352] L11V: es una mutación de alineación de línea germinal. Val está en el gen IMGT No. IGHV1-69-2*01 de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0353] S17T: es una mutación de alineación de la línea germinal. Thr está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

30

[0354] L20I: es una mutación de alineación de la línea germinal. Ile está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0355] T23K: es una mutación de alineación de la línea germinal basada en la frecuencia. Lys es más frecuente en esta posición. Lys está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0356] N28T: esta es una sustitución del residuo CDR-H1 por Thr. N28T es una mutación de alineación de la línea germinal. Thr está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0357] K38R: es una mutación inversa basada en frecuencia. Arg es más frecuente en esta posición. Se predice que Arg en esta posición forma dos enlaces H con Glu 46 además de un enlace H cada uno con Asp86 y Tyr 90 en la cadena pesada; por lo tanto, la sustitución de Arg puede mejorar la estabilidad sobre Lys en esta posición.

[0358] E42G: es una mutación de alineación de línea germinal basada en la frecuencia. Gly está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición. Gly es más frecuente en esta posición. Se predice que la sustitución de Gly no afectará la estabilidad.

[0359] Q43K: Se predice que la cadena lateral de Lys en esta posición forma un enlace H con G42 además de que la cadena principal forma enlaces H con Gln 39 y Arg 40, por lo que la sustitución de Lys puede mejorar la estabilidad sobre Q en esta posición. Q43K es una mutación de alineación de la línea germinal. Lys está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0360] N54D y D56E son sustituciones de residuos de CDR y se predice que son posiciones sin contacto con el antígeno según el modelo de homología. Se prevé que las sustituciones de N54D y D56E estabilicen la estructura del anticuerpo. N54D y D56E son mutaciones que alinean la línea germinal. Asp está en la posición H54 y Glu está en la posición H56 en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25).

[0361] V58I: es una sustitución de un residuo CDR-H2. El gen de la línea germinal IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) tiene Ile en esta posición. Se predice que este residuo no entrará en contacto con el antígeno.

[0362] K66R: Se predice que Arg en esta posición forma enlaces H con Ser 82a y Thr 83 además de formar enlaces H y puentes salinos con Asp 86. K66R es una mutación de alineación de línea germinal. Arg está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0363] A67V: es una sustitución de un residuo de la zona Vernier. El gen de la línea germinal IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) tiene Val en esta posición.

[0364] S75T: Se predice que Ser en esta posición forma un enlace H con Asp 72 y Tyr 76. Se predice que Thr en esta posición también hace estos contactos, pero siendo residuo expuesto en la superficie, Thr puede mejorar la estabilidad del anticuerpo. S75T es una mutación de alineación de la línea germinal. Thr está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0365] N76D: Asp es una mutación de alineación de línea germinal. Asp está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0366] L80M: Met es una mutación de alineación de la línea germinal. Met está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0367] Q81E: se predice que Glu forma un enlace H más un puente salino con K19; por tanto, Glu en esta posición mejora la estabilidad del anticuerpo. Q81E es una mutación de alineación de línea germinal. Glu está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0368] T83R mejora la termoestabilidad y aumenta la humanidad. Arg es una mutación de alineación de la línea germinal. Arg está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición. Arg es más frecuente en esta posición.

[0369] Y91F: es una mutación de un residuo de interfaz y es una mutación inversa. Tyr en esta posición, puede mejorar la estabilidad del anticuerpo.

[0370] A93S: es una retro-mutación de una zona de Vernier y un residuo de zona de interfaz.

[0371] S94T: es una retro-mutación de un residuo estructural canónico definido por Chothia y un residuo de vernier.

[0372] T108L: Leu es una mutación de alineación de la línea germinal. Leu está en el gen de la línea germinal humana IMGT No. IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) en esta posición. Se predice que Leu en esta posición hará que el anticuerpo sea menos inmunogénico y no tenga ningún impacto sobre la estabilidad del anticuerpo.

[0373] L109V: es una mutación basada en frecuencia. Val es más frecuente en esta posición. L109V es una mutación de alineación de la línea germinal. Val está en el gen IMGT No. IGHV1-69-2*01 de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 25) en esta posición.

[0374] La justificación para la selección de las posiciones indicadas en la Tabla 4 en la región variable de cadena ligera como candidatos para la sustitución son los siguientes.

[0375] *Regiones variables de cadena ligera kappa*

5 [0376] *hu3D6VLvb1*

- consiste en los bucles CDR-L1, L2 y L3 de 3D6-VL injertados en el marco de ARX71335 VL.

[0377] *hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3*

- revierte todas las sustituciones marco en posiciones que son clave para definir las clases canónicas de Chothia, son parte de la zona Vernier o se ubican en la interfaz de dominio VH/VL. Hu3D6-VLvb2 y Hu3D6-VLvb3 también incluyen sustituciones que contribuyen a la estabilidad estructural; hu3D6-VL_vb2 incorpora las retro-mutaciones T7S, I15L, L83V, H86Y y L106I, para permitir la evaluación de las contribuciones de estas posiciones a la afinidad de unión al antígeno e inmunogenicidad.
- 15 Hu3D6-VL_vb3 todas las sustituciones mencionadas para vb2 junto con cambios adicionales en Q17E, K24R, L37Q, K45R y L106I

20 [0378] T7S: es una mutación de alineación de la línea germinal. Ser está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0379] T10S: es una mutación de alineación de línea germinal basada en la frecuencia. Ser es frecuente en esta posición. Ser está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

25 [0380] I15L: es una mutación de alineación de la línea germinal. Leu está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0381] Q17E: Se predice que Glu en esta posición forma un enlace H con T14 y un puente salino con Lys 107, ambos residuos de cadena ligera, y que mejora la estabilidad del anticuerpo.

30 [0382] K24R: es una mutación de un residuo de CDR. Se predice que tanto Lys como Arg forman enlaces H y puentes salinos con Asp 70 en la cadena ligera. Se predice que Arg se adapta mejor a la conformación. Arg también es una mutación de alineación de la línea

germinal. Arg está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0383] L37Q: se predice que es un residuo profundamente enterrado, no se predice que Leu interaccione con los residuos circundantes, mientras que se predice que Gln forma enlaces H con Q38 y Asp 82 en la cadena ligera. Gln también es una mutación de alineación de la línea germinal. Gln está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0384] K45R: aunque se predice que Lys forma enlaces H con S56 y Gly 57; la interacción prevista de Arg con los residuos circundantes es mucho más extensa, ya que se prevé que forme puentes salinos con D55, enlace H con Arg46 y enlaces dobles H con S56. Arg también es una mutación de alineación de la línea germinal. Arg está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0385] L83V: esta es una mutación basada en la frecuencia de un residuo que se predice que estará expuesto en la superficie. Val también es una mutación de alineación de la línea germinal. Val está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0386] H86Y: 3D6 VL Murino tiene Tyr en esta posición. Tyr también es el residuo más frecuente en esta posición.

[0387] A100Q: Ala es raro en esta posición. Se predice que Ala sea un residuo expuesto a la superficie y no se predice que interaccione con los residuos circundantes. Gln es más frecuente en esta posición. y también es una mutación de alineación de la línea germinal. Gln está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición. Se predice que Gln forma un enlace H con la intracadena estabilizante de Ser 7.

[0388] L106I: es una mutación de alineación de línea germinal basada en frecuencia. Ile es más frecuente en esta posición. Ile está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27) en esta posición.

[0389] Los diseños basados en estos marcos humanos fueron:

Regiones variables de cadena pesada

>hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTV
YDPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

5 >hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENGDTV
YDPKFQGRATITADTSTDYALELSSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

>hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)

10 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENGDTIY
DPKFQGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)

15 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENGDTIY
DPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

>hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)

20 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDGETIY
DPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

>hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDGETVY
DPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

25 >hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDGETVY
DPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

Regiones variables de cadena ligera kappa

30

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)

DVVMQTPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTTHFPYTFGAGTKLELKR

>hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)

5 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGAGTKLEIKR

>hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)

10 DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWLQRPQGQSPRRLIYLVSKLD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGQGTKLEIKR

[0390] Las secuencias humanizadas se generan utilizando un protocolo de PCR de dos etapas que permite la introducción de múltiples mutaciones, deleciones e inserciones utilizando la mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange [Wang, W. y Malcolm, B.A. (1999) *BioTechniques* 26: 680-682).

[0391] **Ejemplo 4.** Anticuerpos monoclonales de ratón se unen a tau en ensayos ELISA

[0392] Métodos: ELISA indirecto: se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con anticuerpos de captura anti-6xHis (Figura 3A) o anti-tau policlonal (Dako # A0024, Figura 3B) suspendidas en 1xPBS durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Se retiró el recubrimiento y se bloquearon las placas durante 1 hora con BSA al 1% en 1xPBS, seguido de incubación con tau recombinante humana, ya sea con (Figura 3A) o sin (Figura 3B) una etiqueta de polihistidina en el extremo N de la proteína. Después del lavado, las placas se incubaron con los anticuerpos indicados, se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP. Las placas se desarrollaron con TMB, y A₄₅₀ se midió con un lector de placas.

[0393] Intercalado de ELISA: se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con anticuerpos anti-ratón en 1xPBS durante 2 horas a temperatura ambiente o 16 horas a 4°C. Se retiró el recubrimiento y se bloquearon las placas durante 1 hora con BSA al 1% en 1xPBS. A continuación, la placa se incubó con los anticuerpos indicados en concentraciones idénticas, se diluyó en BSA al 0.1% en 1xPBS. Las placas se trataron sucesivamente con

tau humana, anti-tau de conejo policlonal (Dako # A0024) y anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con HRP, todos diluidos en BSA al 0.1% en PBS con lavados que se producen entre cada etapa. Se añadió estreptavidina-HRP, se desarrollaron placas con TMB y se midió A_{450} con un lector de placas. Ver la Figura 3C.

[0394] Resultados: Un panel de hibridoma - anticuerpos producidos se ensayaron para la unión a tau a través de un número de diferentes formatos de ELISA. La detección de tau se confirmó utilizando un formato indirecto, utilizando proteína tau inmovilizada por su etiqueta de polihistidina fusionada en el extremo N (Figura 3A). También se confirmó la unión a la proteína nativa sin etiquetar (Figura 3B). Para evaluar la afinidad de la solución de los diversos anticuerpos, se utilizó un formato ELISA tipo intercalado en el que se utilizaron anticuerpos de hibridoma analizados como reactivos de captura (Figura 3C).

[0395] **Ejemplo 5.** Afinidad de anticuerpos monoclonales de ratón a tau

[0396] Métodos: El análisis de SPR se realizó con un Biacore T200 para determinar la cinética de unión de los anticuerpos murinos a la tau humana recombinante. Para preparar una superficie del sensor, se inmovilizó el anticuerpo anti-ratón (GE Life Sciences) en el chip sensor CM5 a través del acoplamiento de amina, y se capturó el anticuerpo a un nivel para asegurar la unión máxima de 50 RU. Se pasaron varias concentraciones de tau recombinante que oscilaban entre 10 y 0.14 nM sobre el ligando capturado a una velocidad de flujo de 50 μ l/min en el tampón de funcionamiento (HBS + 0.05% P-20, 1 mg/ml de BSA), durante 180 segundos de asociación y Disociación de 900 seg. Los datos se hicieron doble referencia tanto a un sensor irrelevante que no contiene un ligando de anticuerpo como a concentración de analito 0 de nM para explicar la disociación del ligando del resto de captura. Luego se analizaron los datos utilizando un ajuste global 1:1.

[0397] Resultados: Se seleccionaron múltiples anticuerpos murinos en función de su desempeño en una batería de ensayos ELISA, y sus afinidades de unión se evaluaron mediante SPR. Los anticuerpos se probaron en series paralelas y se compararon sus tasas de asociación y disociación de unión para seleccionar el aglutinante más alto para tau humana recombinante. La mayor afinidad de unión se observó con el clon de anticuerpos 3D6. Las afinidades de unión se muestran en la Figura 6.

[0398] **Ejemplo 6.** Los anticuerpos monoclonales de ratón evitan la unión de tau humana a la superficie de células neuronales inmortalizadas

[0399] Métodos: Inhibición de la unión de Tau a células de neuroblastoma B103 con anticuerpos monoclonales anti-Tau

1. Resuspender las células B103 en PBS a 5×10^5 células/ml. Placa de 50 μ l de suspensión celular por pocillo en una placa MSD High Bind. Esto da como resultado 25K
5 células/pocillo. Cubrir la placa y permitir que las células se unan a 37 ° C, 5% de CO₂, durante 2 hrs.

2. Luego de la fijación de la célula, retire el PBS de los pocillos invirtiendo la placa y golpeando suavemente para eliminar el exceso de tampón. Agregue 50 μ l de 3% de Bloqueador A de MSD en PBS u otro tampón de bloqueo adecuado a cada pocillo e incube
10 la placa a temperatura ambiente durante 1 hora sin agitar.

3. Durante la etapa de bloqueo de la placa, co-incube los anticuerpos Tau y anti-Tau de la siguiente manera:

a. Comience con un anticuerpo anti-Tau a 2 mg/ml y diluya en serie en PBS, 1:2, para 7 diluciones adicionales.

15 b. Diluya Tau a 20 nM en PBS. La concentración de Tau será constante en cada pocillo.

c. Mezcle el anticuerpo Tau y anti-Tau, 1:1, para obtener una concentración final de Tau de 10 nM y una concentración inicial de anti-Tau de 1 mg/ml.

d. Incube la mezcla durante aproximadamente 1 hora a temperatura
20 ambiente con agitación (600 rpm).

4. Después del bloqueo de la placa, paso 2, elimine el tampón de bloqueo de los pocillos invirtiendo la placa y golpeando suavemente y lave la placa 2x con PBS con una pipeta multicanal. Asegúrese de que el exceso de tampón se haya eliminado por completo. Enfriar las células revestidas a 4°C antes de agregar los complejos Tau: anti-Tau.

25 5. Agregue 50 μ l de complejo enfriado, paso 3, a las células revestidas e incube en hielo durante 30 minutos.

6. Lave la placa 2x con PBS enfriado como se describió anteriormente.

7. Añada 50 μ L por pocillo del 16B5.SULFO-TAG para la detección de Tau unido a la superficie celular. Incube durante 30 minutos en hielo.

30 8. Lave la placa 2x con PBS enfriado de nuevo como se describió anteriormente.

9. Añada 150µL por pocillo de 1X tampón de lectura T Sin Tensioactivo (diluido en H₂O) y lea inmediatamente en el instrumento MSD SECTOR™ 600. Evite introducir burbujas al agregar el tampón de lectura.

10. Reporte las señales de MSD frente a la concentración de anti-Tau.

5 [0400] Los anticuerpos probados fueron anticuerpos anti-tau 3D6, 16G7, 3H9, 4C5 y 5G8, y control de isotipo.

[0401] Resultados:

[0402] La disminución de la señal anti-tau de SulfoTag que se produce al aumentar el anticuerpo de prueba indica un bloqueo funcional de la unión de tau a las superficies de las
10 células neuronales. No se observó bloqueo con control de isotipo, 16G7 o 3H9. Se observaron cantidades crecientes de actividad de bloqueo funcional con 4C5, 5G8 y 3D6. 3D6 demostró la actividad de bloqueo más profunda de los anticuerpos probados. Vea la figura 5.

[0403] **Ejemplo 7.** Actividad de desagregación

15 [0404] Métodos: Agregación de tau recombinante: la tau recombinante purificada con una etiqueta 6xHis N-terminal se combinó con cantidades equimolares de heparina de bajo peso molecular en 1xPBS (pH 7,4) y se incubó a 37°C durante 96 horas en un nutador. La agregación de la muestra se confirmó mediante la unión a tioflavina T.

Incubación con anticuerpos: los anticuerpos se incubaron con tau recombinante agregada
20 en las relaciones molares indicadas, se incubaron a 37°C durante 96 horas sin rotación ni nutación. Al final del experimento, se midió la agregación incubando muestras con 25 mM Tioflavina T y medición de la fluorescencia emitida (450/482 ex/em). Las señales se restaron de fondo a muestras de tampón.

[0405] Resultados: Como se muestra en la Figura 6, 3D6 desmonta preferentemente las
25 fibrillas de tau intactas. Se incubaron relaciones molares variables de 3D6 (triángulos), control de isotipo (círculos) y 16G7 (cuadrados) con fibrillas de tau que contenían amiloide durante 96 horas. Al final de este período, se evaluó la extensión de la agregación mediante la unión a la tioflavina T. 3D6 disminuye de manera preferencial la señal de tioflavina T presente en la muestra, en comparación con un isotipo Control de anticuerpos, así como a
30 16G7, un anticuerpo anti-tau que se une a una región diferente de tau.

[0406] **Ejemplo 8.** Tau de inmunocaptura de 3D6 y 5G8 de tejido de enfermedad humana.

[0407] Métodos: Se prepararon fracciones de proteínas solubles en alto contenido en sal a 1 mg/ml. Para cada inmunoprecipitación, se utilizaron 200 µg de muestra. 10 µg del anticuerpo indicado (ya sea un control de isotipo añadido, 3D6, o anticuerpo anti-tau 5G8) a las preparaciones de muestra con alto contenido de sal, y se incubó durante 2 h. Luego se agregaron perlas magnéticas de proteína G a las mezclas y se incubaron durante una hora más para capturar los complejos de anticuerpo/antígeno. Las muestras se lavaron a fondo con 1xPBS y las perlas se hirvieron en tampón de muestra reductor/desnaturalizante para liberar las proteínas capturadas. Las muestras resultantes se resolvieron mediante SDS-PAGE y la transferencia Western se realizó utilizando un anticuerpo policlonal anti-tau (Dako, # A0024).

[0408] Resultados: como se muestra en la Figura 7, tau inmunoprecipita 3D6 y 5G8 del tejido de la enfermedad de Alzheimer. Las fracciones solubles en alto contenido en sal se inmunoprecipitaron con el anticuerpo indicado y se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-tau dirigido hacia una región separada de la molécula de tau de los sitios de unión para 3D6 y el anticuerpo A de tau A. 3D6 capturó tau de esta fracción. La entrada (muestra soluble en sal alta) se muestra a la derecha.

[0409] **Ejemplo 9.** Inmunorreactividad inmunohistoquímica de 3D6,

[0410] Las cortezas frontotemporales se obtuvieron de pacientes sin enfermedad neurodegenerativa o con enfermedad de Alzheimer, que se confirmó después de la evaluación post mortem. La inmunohistoquímica se realizó en criosecciones montadas en portaobjetos de 10µm ligeramente fijadas con acetona. Todas las etapas de tinción se realizaron con un autostainer Leica BOND Rx, utilizando consumibles Leica. Cualquiera de murino o de una forma humana de 3D6 se incubó con cortes de tejido seguido de la adición de anticuerpos secundarios en especies apropiada conjugados con un polímero HRP. Para prevenir la unión no específica de inmunoglobulina endógena cuando se usan anticuerpos humanizados en tejido humano, los anticuerpos se marcaron de manera no covalente con un monovalente anti-humano conjugado con biotina. Fragmento Fab in vitro antes de la incubación en tejido. Tissue marcada con el complejo de fragmento Fab de anticuerpo-biotina primario se amplificó adicionalmente utilizando un sistema de amplificación biotina avidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La tinción se visualizó con un cromógeno DAB, que produjo un depósito marrón. El control negativo consistió en realizar todo el

procedimiento inmunohistoquímico en secciones adyacentes con una IgG isotipo de control de anticuerpos.

[0411] Los anticuerpos analizados fueron CD6 murino, 3D6 quimérico (que contenía VH y VL del anticuerpo murino con regiones constantes humanas, SEQ ID NO: 72 de cadena pesada y SEQ ID NO: 73 de cadena ligera), y la variante humanizada hu3D6VHv5/hu3D6VLv2.

[0412] La tinción realizada con formas murinas, quiméricas y humanizadas de 3D6 se comparó cualitativamente y se evaluó la fuerza e intensidad de la tinción, así como la localización de la inmunorreactividad. La intensidad de la tinción fue similar para las formas quiméricas y humanizadas de 3D6, y mostró patrones de localización similares en comparación con la forma murina del anticuerpo. Se detectó tau en enredos neurofibrilares, fibrillas, hilos neuropilos y en axones degenerativos. También se detectó notable tinción somal.

[0413] **Ejemplo 10.** Afinidad de variantes humanizadas hacia tau.

[0414] Métodos: Se recubren placas de poliestireno de 96 pocillos de ELISA indirecto con tau recombinante humana suspendida en 1xPBS durante 2h a TA o 16h a 4°C. Se retira el revestimiento y las placas se bloquean durante 1h con BSA al 1% en 1xPBS. Se añaden anticuerpos variantes humanizados a 1 µg/ ml en BSA al 0.1% en 1xPBS a las placas durante 1 hora seguido de lavado, y se añaden anticuerpo antihumano de cabra conjugado con HRP. Las placas se desarrollan con TMB y la A₄₅₀ se mide con un lector de placas.

[0415] Intercalado de ELISA: Se recubren placas de poliestireno de 96 pocillos con anticuerpos antihumanos en 1xPBS durante 2 horas a TA o 16 horas a 4°C. Se retira el revestimiento y las placas se bloquean durante 1 hora con BSA al 1% en 1xPBS. Se añaden a las placas anticuerpos variantes humanizados a concentraciones variables diluidos en BSA al 0.1% en 1xPBS durante 1 hora seguido de lavado, y se añade tau humana recombinante biotinilada diluida en BSA al 0.1% en 1xPBS. Después del lavado, se añade Estreptavidina-HRP, se revelan las placas con TMB y se mide el A₄₅₀ con un lector de placas.

[0416] **Ejemplo 11.** Análisis de variantes de 3D6 humanizado

[0417] Se analizaron las variantes de 3D6 humanizado para varias características, incluida la afinidad de unión al objetivo, la actividad en ensayos basados en células, la termoestabilidad, el título de expresión y la presencia de agregación.

[0418] Se generaron plásmidos que contenían ADN que codificaba cadenas pesadas hu3D6VHvb1, h3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, h3D6VHvb6 y h3D6VHvb7 y cadenas ligeras hu3D6VLvb1, hu3D6VLvb2 y hu3D6VLvb3. Se expresaron transitoriamente diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras como anticuerpos intactos en células HEK-293, y los anticuerpos se purificaron a partir de medios acondicionados usando cromatografía de proteína A. Los anticuerpos purificados se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño-cromatografía líquida de alto rendimiento (SEC-HPLC) para detectar la presencia de agregación. Los resultados se presentan en la Tabla 9, en la columna denominada “% de monómero”.

[0419] Los anticuerpos purificados se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la termoestabilidad de cada variante. Los valores de termoestabilidad se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Todos los barridos de DSC se realizaron utilizando un sistema de DSC capilar VP (Malvern). Todas las muestras se prepararon a 0.5 mg/mL en 1xPBS y se referenciaron a 1xPBS. Se introdujeron aproximadamente 0.5 ml de solución de proteína y tampón en la muestra y la célula de referencia. Se llevaron a cabo velocidades de barrido calorimétrico a velocidades de barrido de 60°C/hora, de 25°C a 110°C bajo presión constante. El análisis se realizó utilizando el software de origen. Los valores informados son la temperatura a la que se registra la capacidad calorífica máxima del pico Fab. Los resultados se presentan en la Tabla 9, en la columna denominada “Termoestabilidad (°C)”.

[0420] El título se determinó como sigue. Después de la expresión en 293células de suspensión, los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de proteína A utilizando métodos estándar. Después de la purificación, los anticuerpos se intercambiaron en 1xPBS y se determinaron las concentraciones de proteína mediante absorbancia a 280 nm. Los títulos se calcularon dividiendo el rendimiento final de proteína purificada entre el volumen inicial del cultivo de expresión y se reportaron en miligramos por litro. Los resultados se presentan en la Tabla 9, en la columna denominada “Título de expresión (mg/L)”.

[0421] La afinidad de las variantes humanizadas purificadas con tau se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). El análisis de SPR se realizó usando un Biacore T200 para determinar la cinética de unión de los anticuerpos humanizados a la tau humana recombinante. Para preparar una superficie de sensor, se inmovilizó un anticuerpo

antihumano (*GE Life Sciences*) en el chip sensor CM3 mediante acoplamiento de amina, y el anticuerpo se capturó a un nivel para asegurar la unión máxima de 50 RU. Se pasaron varias concentraciones de tau recombinante entre 50-0.62 nM sobre el ligando capturado a una velocidad de flujo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ en tampón de funcionamiento (HBS + P-20 al 0.05%, 1 mg/ml de BSA), en forma de un ciclo único. Los datos fueron doblemente referenciados tanto a un sensor irrelevante que no contenía ligando de anticuerpo como a una concentración de analito de 0 nM para explicar la disociación del ligando de la fracción de captura. Luego, los datos se analizaron usando un ajuste 1:1. Los resultados se presentan en la Tabla 9, en las columnas etiquetadas como " k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), k_{off} (s^{-1}) y K_d (nM)".

[0422] La capacidad de las variantes humanizadas purificadas para bloquear la internalización de tau se determinó mediante ensayos de internalización celular. Se realizó un ensayo de internalización que emplea clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para evaluar la capacidad de varios anticuerpos para bloquear la internalización neuronal de tau. Los anticuerpos que bloquean la internalización probablemente bloqueen la transmisión de tau. Se preincubó oligómero soluble 4R0N de tau humano P301L marcado con pHrodo (concentración final de 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con variantes humanizadas (titulación de la dosis: concentración inicial de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ seguida de diluciones seriadas de 4 veces) durante 30 min a temperatura ambiente en medio de cultivo celular. A continuación, se añadió la mezcla de Tau/anticuerpo a las líneas celulares de neuroblastoma B103 a una concentración final de 500,000 células/ml y se incubó durante 3-4 horas a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos (5% de CO_2). A continuación, las células se lavaron 3 veces con medio de cultivo, seguido de 10 minutos de incubación del medio de cultivo y se lavaron 2 veces con tampón FACS (FBS al 1% en PBS). Las células se resuspendieron en 100 μl de tampón FACS y se midió la intensidad de fluorescencia media de rojo Texas mediante FACS LSR II. La fluorescencia de rojo Texas de pHrodo se activa por un pH bajo asociado con compartimentos endolisosomales tras la internalización. Debido a que FACS detecta células y pHrodo solo emite fluorescencia tras la internalización, solo se detecta la tau internalizada por las células. Cuanto menor sea la intensidad de fluorescencia media, menor será la cantidad de tau internalizada y mayor actividad de bloqueo del anticuerpo analizado. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del Ensayo de Características Biofísicas/de Expresión, Afinidad, e Internalización para las Variantes de 3D6 Humanizado

Nombre del Anticuerpo		Características Biofísicas/de Expresión			Afinidad			Inhibición de internalización basada en células (a concentración de anticuerpos de 133 nM, % de inhibición de señal fluorescente máxima)
Cadena Pesada	Cadena Ligera	Termoestabilidad (°C)	Título de Expresión (mg/L)	% de Monómero	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (nM)	
Hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	69.4	176	96	1.40E+06	9.00E-04	0.64	80.0
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.4	478	98	1.50E+06	5.70E-05	0.04	84.9
Hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	83.5	435	100	1.60E+06	3.00E-04	0.19	85.0
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.8	528	100	1.40E+06	1.50E-03	1.07	71.2
Hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	83.15	529	100	1.60E+06	1.80E-03	1.13	72.1
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	81.3	557	98	6.90E+05	2.90E-03	4.20	61.0
Hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	83.5	575	100	9.10E+05	3.40E-03	3.74	49.0
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.6	597	100	1.80E+06	2.60E-03	1.44	67.2
Hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	82.9	612	100	2.00E+06	2.80E-03	1.40	67.7
Hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	79.9	395	100	3.45E+06	3.69E-04	0.107	76.3
Hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)	Hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)	82.5	350	100	3.54E+06	5.38E-04	0.152	70.0
Hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	80.6	478	100	3.09E+06	7.79E-04	0.252	74.5

Listado de Secuencias

[0423] P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPL
 5 QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGI
 GDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQA
 NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKV
 AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNV
 QSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK
 10 DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL
 SNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

[0424] P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPL
 QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTG
 15 SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRS
 GYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLK
 NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL
 SKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKL
 TFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLA
 20 KQGL

[0425] P10636-6 (4RON tau humana) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAE EA
 GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQ
 ANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKK
 25 VAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSN
 VQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
 KDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL
 LSNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL

[0426] P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPL
 30 QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGI

GDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQA
 NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKV
 AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLK
 VTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
 5 RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAK
 QGL

[0427] P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL
 QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTG
 10 SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRS
 GYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLK
 NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL
 FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSR
 HLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

15 [0428] P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEAA
 GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQ
 ANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKK
 VAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDSL
 20 KVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT
 FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLA
 KQGL

[0429] SEQ ID NO:7; Secuencia de aminoácidos de 3D6 VH Murino

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGW
 25 IDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVS
 S

[0430] SEQ ID NO:8; HCDR1 de Kabat/Chothia:

GFNIKDYLLH

[0431] SEQ ID NO:9; HCDR2 de Kabat:

30 WIDPENGDTVYDPKFQG

[0432] SEQ ID NO:10; HCDR3 de Kabat:

LDF

[0433] SEQ ID NO:11; Secuencia de Aminoácidos de 3D6 VL Murino:

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRL
IYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGKLEIKR

5 [0434] SEQ ID NO:12; LCDR1 Murino de Kabat:

KSSQSLLDSDGKTYLN

[0435] SEQ ID NO:13; LCDR2 Murino de Kabat:

LVSKLDS

[0436] SEQ ID NO:14; LCDR3 Murino de Kabat:

10 WQGTHFPYT

[0437] SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSCSKASGFNIKDYLLHWVRQAPEQGLEWIGW
IDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTLVTVS
S

15 [0438] SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIDYLLHWVRQAPEQGLEWMG
WIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDNAVYYCSTLDFWGQGTLVT
VSS

[0439] SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

20 EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTLVTVS
S

[0440] SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDATAYLQLGSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTLVTVS
S

[0441] SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

30 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPQGQGLEWIGWI
DPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDATAYLQLGSLTSEDNAVYFCSTLDFWGQGTLVTVS
S

[0442] SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKR
LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK
R

[0443] SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

5 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRR
LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK
R

[0444] SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

10 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRR
LIYLVSKLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK
R

[0445] SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

15 DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKR LI
YLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIKR
[0446] SEQ ID NO:24; acceptor variable de cadena pesada Acc.No. BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGT FGSYAISWVRQAPGQGLEWMG
RIIPILGIATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSED TAVYYCARGKGEFEGMDVWG
QGTTVTVSS

20 [0447] SEQ ID NO:25; acceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGHV1-69-
2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWVQAPGKGLEWMG
LVDPEGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCAT

[0448] SEQ ID NO:26; acceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGKJ1*01

QHWGQGTLVTVSS

25 [0449] SEQ ID NO:27; acceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKV2-30*02
Acc. No. IMGT No. IGKV2-30*02

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPR
RLIYKVS NRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGT HWP

[0450] SEQ ID NO:28; acceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKJ2*01

30 YTFGQG TKLEIK

[0451] SEQ ID NO:29; Aceptor variable de cadena ligera Acc. No. AAZ09048.1

DVVMTQSPLSLTVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPR
 RLIYRVSHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTYWPLTFGQGTKL
 EIK

[0452] SEQ ID NO:30; Secuencia de ácido nucleico de 3D6 VH murino:

5 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGCCAGGGGGCC
 TTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATTTGCACTG
 GGTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGA
 ATGGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACA
 CATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
 10 TCTATTTCTGTTCTACCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTC
 A

[0453] SEQ ID NO:31; Secuencia de ácido nucleico de 3D6 VL murino:

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACA
 ACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACA
 15 TATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGG
 TGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTG
 GCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG
 T

20 [0454] SEQ ID NO:32; CDR-H1 Murino de Kabat
 DYYLH

[0455] SEQ ID NO:33; CDR-H1 Murino de Chothia
 GFNIKDY

[0456] SEQ ID NO:34; CDR-H2 Murino de Chothia
 25 DPENG D

[0457] SEQ ID NO:35; CDR-H2 Murino de AbM
 WIDPENGDTV

[0458] SEQ ID NO:36; CDR-L1 Murino de Contacto
 KTYLNWL

30 [0459] SEQ ID NO:37; CDR-L2 Murino de Contacto
 RLIYLVSKLD

[0460] SEQ ID NO:38; CDR-L3 Murino de Contact
WQGTHFPY

[0461] SEQ ID NO:39; CDR-H1 Murino de Contacto
KDYYLH

5 [0462] SEQ ID NO:40; CDR-H2 Murino de Contacto
WIGWIDPENGDTV

[0463] SEQ ID NO:41; CDR-H3 Murino de Contact
STLD

10 [0464] SEQ ID NO:42; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia
GFTIKDYYLH

[0465] SEQ ID NO:43; CDR-H2 Alterno de Kabat
WIDPEDGDTVYAPKFQG

[0466] SEQ ID NO:44; secuencia de aminoácidos de consenso de VH de la Figura 2 de
PCT/IB2017/052544

15 EVQLVQSGAEVVPXGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGXATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTSLTVS
S

[0467] SEQ ID NO:45; secuencia de aminoácidos de consenso de VL de la Figura 3 de
PCT/IB2017/052544

20 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKR
LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGKLEIK
R

[0468] SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWV
DPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDYALELGSLSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTSLTVS
S

[0469] SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

30 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWI
DPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDYALELGSLSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTSLTVS
S

[0470] SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYLLHWVRQRPEQGLEWMG
WIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLVT
VSS

[0471] SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

5 EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYLLHWVRQRPEQGLEWMG
WVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLVT
VSS

[0472] SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

10 EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWI
DPENGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVS
S

[0473] SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

15 EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGW
VDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELGSLSLTSEDVAVYFCSTLDYWGQGTTTLTV
SS

[0474] SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

20 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDYYLLHWVRQAPGKGLEWMGW
IDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVT
SS

[0475] SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYLLHWVRQAPGKGLEWMG
WIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVT
VSS

[0476] SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

25 EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYLLHWVRQAPGKGLEWMG
WVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLV
TVSS

[0477] SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

30 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNKDYYLLHWVRQRPGKGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLELGSLSLTSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLVT
S

[0478] SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYLLHWVRQRPKGKLEWMG
WIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTDYALELGSLTSEDYAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

5 [0479] SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYLLHWVRQRPKGKLEWMG
WVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDYALELGSLTSEDYAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[0480] SEQ ID NO:58; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia (como en hu3D6VH1c).

10 GFNFKDYLLH

[0481] SEQ ID NO:59; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia, (como en hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

GYTFTDYLLH

[0482] SEQ ID NO:60; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia (como en hu3D6VHv3b y
15 hu3D6VHv4b)

GYNFKDYLLH

[0483] SEQ ID NO:61; CDR-H2 Alterno de Kabat (como en hu3D6VHv1bA11B6G2).

WVDPEDGDTVYAPKFQG

[0484] SEQ ID NO:62, CDR-H2 Alterno de Kabat (como en hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, y
20 hu3D6VHv4b).

WIDPENGDTVYDEKFQG

[0485] SEQ ID NO:63; CDR-H2 Alterno de Kabat como en hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

WVDPEDGDTVYAEKFQG

25 [0486] SEQ ID NO:64; CDR-H2 Alterno de Kabat (como en hu3D6VHv1e).

WIDPENGDTVYAEKFQG

[0487] SEQ ID NO:65; CDR-H3 Alterno de Kabat (como en hu3D6VHv1f)

LDY

[0488] SEQ ID NO:66; región variable de cadena pesada del anticuerpo de ratón 6A10.

30 EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCTPLDYWGQGTSTVTS

S

[0489] SEQ ID NO:67; CDR-H1 de Compuesto de Kabat/Chothia del anticuerpo de ratón 6A10.

GLNIKDYYIH

5 [0490] SEQ ID NO:68; CDR-H2 de Kabat del anticuerpo de ratón 6A10.

WIDPENDDTEYAPKFQG

[0491] SEQ ID NO:69; CDR-H3 de Kabat del anticuerpo de ratón 6A10

LDY

[0492] SEQ ID NO:70; Plantilla de estructura VH de Mus (PDB#1CR9_H)

10 KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYQWVKQRPEQGLEWIGWI
DPENGNSEYAPRFQGKATMTADTSLNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQGTTL
TVSS

[0493] SEQ ID NO:71; secuencia de consenso de aminoácidos de VH de las Figuras 4A y 4B de PCT/IB2017/052544

15 EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVS
S

[0494] SEQ ID NO:72; cadena pesada de anticuerpo quimérico de 3D6

20 EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGW
IDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
25 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0495] SEQ ID NO:73; cadena ligera de anticuerpo quimérico de 3D6

30 DVVMTQTPLTSLVTLGTPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRL
IYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0496] SEQ ID NO:74; secuencia de aminoácidos de modelo estructural de variable de cadena pesada Acc.No. 5MYX-VH_mSt

EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPGQGLEWIGQI
YPGDGDNTYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGQGTL
5 VTVSA

[0497] SEQ ID NO:75; secuencia de aminoácidos de aceptor variable de cadena pesada Acc.No. 2RCS-VH_huFrwk

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGR
IDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQGTTTLT
10 VSS

[0498] SEQ ID NO:76; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGW
IDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVS
15 S

[0499] SEQ ID NO:77; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWI
DPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDYLLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLTVTS
20 S

[0500] SEQ ID NO:78; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWI
DPENGDTIYDPKFQGRATITADTSTDYLLSSLRSEDYAVYYCSTLDFWGQGTLTVTS
25 S

[0501] SEQ ID NO:79; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPGKGLEWIGWI
DPENGDTIYDPKFQGRVTITADTSTDYLLSSLRSEDYAVYYCSTLDFWGQGTLTVTS
30 S

[0502] SEQ ID NO:80; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYILHWVRQRPKGKLEWIGWI
DPEDGETIYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLLTVS
S

[0503] SEQ ID NO:81; secuencia de aminoácidos de modelo estructural variable de cadena ligera Acc.No. 5MYX-VL_mSt

DVVLVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLI
YVVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPFTFGSGTKLEIK

[0504] SEQ ID NO:82; secuencia de aminoácidos de aceptor variable de cadena ligera Acc.No. ARX71335-VL_huFrwk

DVVMVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGQSPKRL
IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCEQGTHFPLTFGAGTKLELK

[0505] SEQ ID NO:83; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1

DVVMVTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGQSPKRL
IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTHFPYTFGAGTKLELK
R

[0506] SEQ ID NO:84; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2

DVVMVTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGQSPKR
LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIK
R

[0507] SEQ ID NO:85; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3

DVVMVTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSGKTYLNWLQQRPGQSPR
RLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEI
KR

[0508] SEQ ID NO:86; secuencia de aminoácidos de un CDR-H1 Alternativo de Compuesto de Kabat-Chothia de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb4 y hu3D6VHvb5)

GFTIKDYLLH

[0509] SEQ ID NO:87; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alterno de Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb3 y hu3D6VHvb4)

WIDPENGDTIYDPKFQG

5 [0510] SEQ ID NO:88; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alterno de Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb5)

WIDPEDGETIYDPKFQG

[0511] SEQ ID NO:89; secuencia de aminoácidos de un CDR-L1 Alterno de Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VLvb3)

10 RSSQSLLDSDGKTYLN

[0512] SEQ ID NO:90; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWI
DPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVS
15 S

[0513] SEQ ID NO:91; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWI
DPEDGETVYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVS
20 S

[0514] SEQ ID NO:92; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alterno de Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7)

WIDPEDGETVYDPKFQG

25 [0515] SEQ ID NO:93; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1

CAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGGCAGAATTGGTCAAGCCCGGAGC
GTCAGTGAAGCTGAGCTGCACCGCCTCCGGCTTCAACATCAAAGACTACTATCTTCAC
TGGGTCAAGCAACGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGTTGGATCGACCCAGA
AAACGGCGACACCGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGGAAGGCCACCATCACTGCTGA
30 TACGTCCTCGAACACCGCCTACCTCCAAGTGGAGCTCCCTGACTTCCGAGGACACTGC
CGTGTACTTCTGTTCCACCCTGGACTTCTGGGGACAGGGAAGTACCCTCACCGTGTGTC

CTCGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAC
TTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0516] SEQ ID NO:94; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de
cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2

5 GAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCCGAAGTCGTGAAACCGGGAGCC
AGCGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTTCAACATCAAGGACTATTACCTTCACT
GGGTCAGACAGCGGCCTGGAAAGGGCTTGGAGTGGATCGGATGGATTGACCCCGAG
AACGGCGACACCGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGCGCAACCATCACTGCTGAC
ACCTCCACCGATAACGCGTACCTGGAAGTCTCGAGCCTGACTTCCGAGGATACGGCC
10 GTGTACTTCTGTTCCACCCTGGACTTCTGGGGACAAGGGACTCTGGTCACCGTGTCC
TCGGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACT
TCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0517] SEQ ID NO:95; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de
cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3

15 GAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCGTGAAGCCGGGAGC
CACCGTGAAGATTTTCGTGCAAAGCGTCAGGGTTTAACATCAAGGACTACTATCTGCAC
TGGGTCCGCCAGAGGCCCGGGAAGGGCCTCGAGTGGATCGGTTGGATCGACCCTGA
AAACGGCGACACCATCTACGATCCAAAGTTCCAGGGCAGAGCCACTATTACCGCTGA
CACGAGCACCGATACTGCATACATGGAATTGTCCTCCCTGCGGTCCGAGGATACTGC
20 CGTGTACTACTGTAGCACCTGGACTTCTGGGGACAGGGAACCCTTGTGACCGTGTG
GTCCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCAC
TTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0518] SEQ ID NO:96; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de
cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4

25 GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGTGCTGAAGTCGTGAAGCCCGGCGCA
ACTGTGAAGATTAGCTGCAAGGCCTCAGGGTTACGATCAAGGACTACTATCTGCACT
GGGTCCGCCAACGGCCAGGAAAGGGACTGGAGTGGATCGGATGGATCGATCCTGAA
AACGGCGACACCATCTACGACCCGAAATTTTCAGGGGAGAGTGACCATTACCGCCGAT
ACCTCCACCGACACTGCGTACATGGAAGTGTCCAGCCTTCGGTCCGAGGACACCGCC
30 GTGTACTACTGTTTCGACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTG
TCCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACT

TCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0519] SEQ ID NO:97; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCC
 5 ACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTCACCATCAAAGACTACTACTTGCACT
 GGGTCAGACAGCGCCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATTGACCCCGAG
 GACGGGGGAGACTATCTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGAT
 ACCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTTCCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGCC
 GTGTATTACTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACTGTGTCAA
 10 GCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACTT
 CGGGTGGAAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0520] SEQ ID NO:98; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCC
 15 ACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTCACCATCAAAGACTACTACTTGCACT
 GGGTCAGACAGCGCCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATTGACCCCGAG
 GACGGGGGAGACTGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGA
 TACCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTTCCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGC
 CGTGTATTTCTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACTGTGTCA
 20 AGCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACT
 TCGGGTGGAAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0521] SEQ ID NO:99; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7

GAAGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCAGAAGTCGTGAAGCCTGGAGCC
 25 ACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCTCCGGCTTCACCATCAAAGACTACTACTTGCACT
 GGGTCAGACAGCGCCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGATTGGATTGACCCCGAG
 GACGGGGGAGACTGTGTACGATCCGAAGTTTCAGGGCCGGGTACCATCACGGCTGA
 TACCTCGACCGACACTGCGTACATGGAACCTTTCCTCGCTGCGGTCCGAGGACACCGC
 CGTGTATTACTGTTCCACCCTGGATTTCTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACTGTGTCA
 30 AGCGCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCGCTGGCCCCGTCCTCCAAGTCCACT
 TCGGGTGGAAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCG

[0522] SEQ ID NO:100; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1

GATGTCGTGATGACCCAGACGCCGCTGACCCTGTCCGTGACTATCGGC
CAGCCCGCGTCCATTTCTGTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTGCTGGACTCCGACGGAAA
5 GACCTACCTGAACTGGCTGTTGCAACGGCCGGGACAGTCACCCAAGCGCCTCATCTA
TCTGGTGTCCAAGCTCGACTCGGGAGTGCCTGATAGGTTTTCGGGATCCGGCAGCGG
GACCGACTTCACCCTGAAAATCTCAAGAGTGGAAGCCGAGGACCTTGGTGTCCATTA
CTGTTGGCAGGGTACCCACTTCCCATACACTTTTCGGGGCCGGCACTAAGCTCGAACT
GAAG

10 [0523] SEQ ID NO:101; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2

GATGTCGTGATGACCCAGTCGCCGCTGTCCCTGTCCGTGACCCTGGGA
CAGCCAGCCTCCATTAGCTGCAAGAGCAGCCAGTCCTTGCTGGACTCAGACGGAAAG
ACCTATCTGAACTGGCTGCTGCAAAGGCCCGGCCAGTCCCCGAAGAGACTCATCTAC
15 CTCGTGTCTGAAGCTGGACTCCGGCGTGCTGATCGTTCTCGGGTTCGGGGTCTGGA
ACTGACTTCACCCTCAAAATCTCACGGGTCGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTAC
TGTTGGCAGGGTACCCACTTTCCCTACACTTTTCGGGGCGGGAACTAAGCTTGAGATC
AAG

20 [0524] SEQ ID NO:102; una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3

GATGTCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGTCCCTGAGCGTGACTCTGGGG
GAACCGGCCAGCATTTTCATGCCGGTCCTCACAATCGCTGCTCGACTCCGACGGAAAG
ACCTATTTGAACTGGCTGCAGCAAAGACCAGGACAGTCCCCTCGCCGGCTCATCTAC
CTGGTGTCCAAGCTTGACTCGGGCGTGCCGGATAGGTTCTCCGGGTCCGGAAGCGG
25 CACCGACTTCACTCTGAAAATCTCGCGCGTGGAAGCCGAGGACGTGGGAGTCTACTA
CTGTTGGCAGGGTACCCACTTCCCCTACACGTTTGGCCAGGGTACCAAGCTCGAGAT
CAAG

[0525] SEQ ID NO:103; secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de IgG1 ejemplar

30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP

CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 [0526] SEQ ID NO:104; secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa ejemplar

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 [0527] SEQ ID NO:105; una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de IgG1 ejemplar

GCCAGCACTAAGGGGCCTAGCGTCTTTCCGCTGGCCCCGTCCTCCAAG
TCCACTTCGGGTGGAACCGCGGCACTGGGGTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGA
GCCGGTCACCGTGTCTCTGGAACCTCGGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACTTTCCC
TGCGGTGCTGCAGTCCTCCGGGCTCTACTCGCTGTCAAGCGTGGTCACCGTCCCCGA
15 GCTCATCCCTGGGTACTCAGACCTACATTTGCAACGTGAACCACAAACCTTCCAACAC
CAAGGTGCGACAAGAAAGTGGAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC
GTGTCCCGCCCCCTGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTTCTTCCCGCCTAAGC
CGAAGGACACTCTGATGATCTCGAGAACCCCTGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATG
TGTCCACGAGGATCCGGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGAGTGGAAGTCC
20 ATAACGCCAAGACCAAGCCCCGCGAGGAACAGTACAACCTCAACTTACCGGGTGGTGT
CAGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGATTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAG
TCTCCAACAAGGCGCTGCCGGCCCCCATTGAAAAGACCATCAGCAAGGCTAAGGGCC
AGCCCCGGGAACCACAGGTCTACACCTTGCCCCCTTCCCGGGAGGAAATGACCAAGA
ACCAAGTGTCGCTGACGTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCATCTGACATCGCCGTGG
25 AGTGGGAAAGCAACGGCCAGCCGGAAAACAACCTACAAGACTACCCCGCCTGTGCTG
GACTCCGACGGCTCGTTCTTCTGTATTCCAAGCTCACCGTGGATAAGTCCAGATGG
CAGCAGGGCAATGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCATGAGGCCCTGCACAACCACTAC
ACTCAGAAATCACTGTCCCTTTCCCCCGGAAAGTAA

30 [0528] SEQ ID NO:106; una secuencia de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena ligera kappa ejemplar

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC

142

AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG
5 CCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

143
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente unión a tau humana, que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende los CDR H1, H2 y H3 que comprende las SEQ ID NOS: 8, 9 y 10, respectivamente, excepto que la posición H28 puede estar ocupada por N o T, H54 puede estar ocupada por N o D, H56 puede estar ocupada por D o E, y la posición H58 ocupada por V o I, y una región variable de cadena ligera madura que comprende los CDR L1, L2 y L3 que comprenden las SEQ ID NOS: 12, 13 y 14 respectivamente, excepto que la posición L24 puede estar ocupada por K o R, en donde al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido como se especifica: H1 está ocupada por Q, H5 está ocupada por Q, H11 está ocupada por L, H20 está ocupada por L, H23 está ocupada por T, H38 está ocupada por K, H75 está ocupada por S, H56 está ocupada por E, H58 está ocupada por I, L10 está ocupada por T, L17 está ocupada por E, L24 está ocupada por R, L37 está ocupada por Q, L83 está ocupada por L, L86 está ocupada por H, L100 está ocupada por A o Q, L106 está ocupada por L.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88 o SEQ ID NO: 92, CDR-H3 comprende la SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 89, CDR-L2 comprende la SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende la SEQ ID NO: 14.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 88, CDR-H3 comprende la SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 89, CDR-L2 comprende la SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende la SEQ ID NO: 14.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 comprende la SEQ ID NO: 86, CDR-H2 comprende la SEQ ID NO: 92, CDR-H3 comprende la SEQ ID NO: 10, CDR-L1 comprende la SEQ ID NO: 12 o la SEQ. ID NO: 89, CDR-L2 comprende SEQ ID NO: 13 y CDR-L3 comprende SEQ ID NO: 14.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87.

7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 88.

5 8. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 92.

9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-L1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89.

10 10. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 87.

11. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 88.

15 12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 92.

20 13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recubierto o un anticuerpo quimérico.

25 14. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende una región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y SEQ ID NO: 90-91 y una región variable de cadena ligera madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

30 15. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende una región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y una región variable de cadena ligera madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

16. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende una región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a cualquiera de las SEQ ID NO: 90-91 y una región variable de cadena ligera madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

17. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido tal como se especifica: H93 está ocupada por S y H94 está ocupada por T.

18. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 17, siempre que las posiciones H93 y H94 estén ocupadas por S y T, respectivamente.

19. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 17, en donde la posición H91 en la región VH está ocupada por F.

20. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 17, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H1 está ocupada por E, H5 está ocupada por V, H11 está ocupada por V, H20 está ocupada por I, H23 está ocupada por K, H38 está ocupada por R, H42 está ocupada por G, H43 está ocupada por K, H66 está ocupada por R, H75 está ocupada por T, H76 está ocupada por D, H81 está ocupada por E, H108 está ocupada por L, H109 está ocupada por V.

21. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 20, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, L y V, respectivamente.

22. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 20, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H17 está ocupada por T, H80 está ocupada por M, H83 está ocupada por R.

23. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 22, siempre que las posiciones H17, H80 y H83 en la región VH estén ocupadas por T, M y R, respectivamente.

24. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 22, en donde la posición H58 en la región VH está ocupada por I.

25. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 24, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H28 está ocupada por T, H67 está ocupada por V.

26. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 25, siempre que las posiciones H28 y H67 en la región VH estén ocupadas por T y V, respectivamente.

27. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 22, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado:
5 H54 está ocupada por D, H56 está ocupada por E.

28. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 27, siempre que las posiciones H54 y H56 en la región VH estén ocupadas por D y E, respectivamente.

29. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el
10 aminoácido especificado: H1 está ocupada por Q o E, H5 está ocupada por Q o V, H11 está ocupada por L o V, H17 está ocupada por S o T, H20 está ocupada por L o I, H23 está ocupada por T o K, H28 está ocupada por N o T, H38 está ocupada por K o R, H42 está ocupada por E o G, H43 está ocupada por Q o K, H54 está ocupada por N o D, H56 está ocupada por D o E, H58 está ocupada por V o I, H66 está ocupada por K o R, H67 está
15 ocupada por A o V, H75 está ocupada por S o T, H76 está ocupada por N o D, H80 está ocupada por L o M, H81 está ocupada por Q o E, H83 está ocupada por T o R, H91 está ocupada por F o Y, H93 está ocupada por S, H94 está ocupada por T, H108 está ocupada por T o L, H109 está ocupada por L o V.

30. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las
20 posiciones H91, H93 y H94 en la región VH estén ocupadas por F, S y T, respectivamente.

31. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H20, H23, H38, H42, H43, H66, H75, H76, H81, H91, H93, H94, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, I, K, R, G, K, R, T, D, E, F, S, T, L y V, respectivamente.

25 32. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H38, H42, H43, H58, H66, H75, H76, H80, H81, H83, H93, H94, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, T, I, K, R, G, K, I, R, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente .

33. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las
30 posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H58, H66, H67, H75, H76,

H80, H81, H83, H93, H94 , H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente.

34. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H58, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83 , H93, H94, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, I, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente .

35. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H91 , H93, H94, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, F, S, T, L y V, respectivamente .

36. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 29, siempre que las posiciones H1, H5, H11, H17, H20, H23, H28, H38, H42, H43, H54, H56, H66, H67, H75, H76, H80, H81, H83, H93 , H94, H108 y H109 en la región VH estén ocupadas por E, V, V, T, I, K, T, R, G, K, D, E, R, V, T, D, M, E, R, S, T, L y V, respectivamente .

37. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 está ocupada por S, L10 está ocupada por S, L15 está ocupada por L, L83 está ocupada por V, L86 está ocupada por Y, y L106 está ocupada por I.

38. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 37, siempre que las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 estén ocupadas por S, S, L, V, Y e Y, respectivamente.

39. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 es T o S, L10 es T o S, L15 es I o L, L17 es Q o E, L24 es K o R, L37 es L o Q, L45 es K o R, L83 es L o V, L86 es H o Y, L100 es A o Q, L106 es L o I.

40. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 39, siempre que las posiciones L7, L10, L15, L83, L86 y L106 en la región VL estén ocupadas por S, S, L, V, Y e I, respectivamente.

41. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 39, siempre que las posiciones L7, L10, L15, L17, L24, L37, L45, L83, L86, L100 y L106 en la región VL estén ocupadas por S, S, L, E, R, Q, R, V, Y, Q e I, respectivamente.

42. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 14, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-85.

5 43. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 15, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 76-80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO.: 83-85.

10 44. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 16, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 90-91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO.: 83-85.

15 45. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

20 46. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

 47. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

25 48. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

30 49. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77

y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

50. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

51. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

52. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

53. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

54. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

55. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

56. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

57. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

5 58. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

10 59. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 80 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

15 60. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

20 61. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

62. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

25 63. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 83.

30 64. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91

y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84.

65. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 42, en donde la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

66. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

67. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo es un anticuerpo revestido.

68. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67 que es un anticuerpo intacto.

69. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67 que es un fragmento de unión.

70. El anticuerpo de la reivindicación 69, en donde el fragmento de unión es un anticuerpo monocatenario, Fab o fragmento de Fab'2.

71. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67 que es un fragmento Fab o Fv de cadena sencilla.

72. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el isotipo es IgG1 humana.

73. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 13-65 y 67-72, en donde la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera y la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada.

74. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 73, en donde la región constante de cadena pesada es una forma mutante de una región constante de cadena pesada humana natural que tiene una unión reducida a un receptor Fcγ en relación con la región constante de cadena pesada humana natural.

75. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 73 o la reivindicación 74, en donde la región constante de cadena pesada es del isotipo IgG1.

76. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 75, en donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 103 con o sin la lisina de C-terminal y/o la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104.

77. El anticuerpo de la reivindicación 73 que tiene al menos una mutación en la región constante.

78. El anticuerpo de la reivindicación 77, en donde la mutación reduce la fijación o activación del complemento por la región constante.

79. El anticuerpo de la reivindicación 78 que tiene una mutación en una o más de las posiciones 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 y 331 por numeración de la UE.

80. El anticuerpo de la reivindicación 79 que tiene alanina en las posiciones 318, 320 y 322.

81. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-74, en donde el isotipo es el isotipo IgG2 o IgG4 humano.

82. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-81, en donde el anticuerpo es al menos 95% p/p puro.

83. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo está conjugado con un agente terapéutico, citotóxico, citostático, neurotrófico o neuroprotector.

84. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-83 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

85. Un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de un anticuerpo como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-84.

86. El ácido nucleico de la reivindicación 85 que tiene una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 30-31, 93-99, 100-102 y 105-106.

87. El ácido nucleico de la reivindicación 85 que tiene una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 30-31, 93-97, 100-102 y 105-106.

88. El ácido nucleico de la reivindicación 85 que tiene una secuencia que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 30-31, 98-99, 100-102 y 105-106.

89. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura unida operativamente a una o más secuencias reguladoras para efectuar la expresión en una célula de mamífero de un anticuerpo como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-83.

90. El vector de la reivindicación 89, en donde el ácido nucleico codifica además una región constante de cadena pesada fusionada a la región variable de cadena pesada madura y una región constante de cadena ligera fusionada a la región variable de cadena ligera madura.

91. El vector de la reivindicación 90, en donde la región constante de cadena pesada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 103 con o sin la lisina de C-terminal y la región constante de cadena ligera tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104.

92. Los vectores de la reivindicación 90, en donde la región constante de cadena pesada está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 105 y la región constante de cadena ligera está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 106.

93. El vector de la reivindicación 89, en donde el anticuerpo es un scFv.

94. El vector de la reivindicación 89, en donde el anticuerpo es un fragmento de Fab.

95. El vector de la reivindicación 89, en donde las una o más secuencias reguladoras incluyen uno o más de un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma y señal de terminación de la transcripción.

96. El vector de la reivindicación 89, en donde el ácido nucleico codifica además péptidos señal fusionados a las regiones variables de cadena pesada y ligera maduras.

97. El vector de la reivindicación 89, en donde el ácido nucleico está optimizado por codón para la expresión en una célula huésped.

98. El vector de la reivindicación 89, en donde las una o más secuencias reguladoras incluyen un promotor eucariota.

99. El vector de la reivindicación 89, en donde el ácido nucleico codifica además un gen seleccionable.

100. Un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 85.

5 101. Una célula huésped transformada con el vector de expresión recombinante de la reivindicación 100.

102. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 89.

10 103. Un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprende incorporar el ácido nucleico de la reivindicación 89 en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

15 104. Primer y segundo vectores que comprenden respectivamente ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura, cada uno vinculado operativamente a una o más secuencias reguladoras para efectuar la expresión en una célula de mamífero de un anticuerpo como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-83.

20 105. Los vectores de la reivindicación 104, en donde los ácidos nucleicos además codifican respectivamente una región constante de cadena pesada fusionada a la región variable de cadena pesada madura y una región constante de cadena ligera fusionada a la región variable de cadena ligera madura.

106. Los vectores de la reivindicación 105, en donde la región constante de cadena pesada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 103 con o sin la lisina de C-terminal y la región constante de cadena ligera tiene la secuencia de SEQ ID NO: 104.

25 107. Los vectores de la reivindicación 105, en donde la región constante de cadena pesada está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 105 y la región constante de cadena ligera está codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 106.

108. Una célula huésped que comprende los ácidos nucleicos de la reivindicación 104.

30 109. Un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprende incorporar los ácidos nucleicos de la reivindicación 104 en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

110. Un método para humanizar un anticuerpo de ratón, el método comprende:

(a) seleccionar uno o más anticuerpos aceptores;

(b) identificar los residuos de aminoácidos del anticuerpo de ratón a retener;

5 (c) sintetizar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende CDR de cadena pesada de anticuerpo de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera humanizada que comprende CDR de cadena ligera de anticuerpo de ratón; y

10 (d) expresar los ácidos nucleicos en una célula huésped para producir un anticuerpo humanizado;

en donde el anticuerpo de ratón es 3D6, en donde 3D6 se caracteriza por una región variable de cadena pesada madura de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera madura de la SEQ ID NO: 11.

15 111. Un método para producir un anticuerpo humanizado, quimérico o revestido, el método comprende:

(a) cultivar células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, de modo que las células secreten el anticuerpo; y

(b) purificar el anticuerpo de medios de cultivo celular;

20 en donde el anticuerpo es una forma humanizada, quimérica o revestida de 3D6.

112. Un método para producir una línea celular que produce un anticuerpo humanizado, quimérico o revestido, el método comprende:

(a) introducir un vector que codifica cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y un marcador seleccionable en las células;

25 (b) propagar las células en condiciones para seleccionar células que tengan un número de copia mayor del vector;

(c) aislar células individuales de las células seleccionadas; y

(d) banquear células clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento del anticuerpo;

30 en donde el anticuerpo es una forma humanizada, quimérica o revestida de 3D6.

113. El método de la reivindicación 112 que además comprende la propagación de las células bajo condiciones selectivas y la detección de líneas celulares que naturalmente expresan y secretan el anticuerpo en una cantidad de al menos 100 mg/L/10⁶ células/24 h.

114. Un método para inhibir o reducir la agregación de tau en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una amiloidosis mediada por tau, que comprende administrar al sujeto un régimen eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 84, inhibiendo o reduciendo así la agregación de tau en el sujeto.

115. El método de la reivindicación 114, en donde el anticuerpo es una versión humanizada de 3D6.

116. Un método para tratar o realizar la profilaxis de una enfermedad relacionada con tau en un sujeto, que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-84 y, de este modo, tratar o efectuar la profilaxis de la enfermedad.

117. Un método de la reivindicación 116, en donde la enfermedad relacionada con la tau es la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, el deterioro cognitivo leve, la tauopatía primaria relacionada con la edad, el parkinsonismo posencefálico, la demencia postraumática o la demencia pugilística, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo demencia de Guam, degeneración corticobasal (CBD), demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpo de Lewys de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

118. Un método de la reivindicación 117, en donde la enfermedad relacionada con tau es la enfermedad de Alzheimer.

119. El método de la reivindicación 118, en donde el paciente es un portador de ApoE4.

120. Un método para reducir la transmisión aberrante de tau que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-84 y, por lo tanto, reducir la transmisión de tau.

121. Un método para inducir la fagocitosis de tau que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-84 y, por lo tanto, inducir la fagocitosis de tau.

5 122. Un método para inhibir la agregación o deposición de tau que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-84, inhibiendo así la agregación o deposición de tau.

123. Un método para inhibir la formación de enredos de tau que comprende administrar un régimen eficaz de un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-84.

10 124. Un método para detectar depósitos de proteína tau en un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con la agregación o depósito de tau, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo definido por cualquiera de las reivindicaciones 1-84, y detectar el anticuerpo unido a tau en el sujeto.

15 125. Un método de la reivindicación 124, en donde la enfermedad asociada con la agregación o depósito de tau es la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, deterioro cognitivo leve, tauopatía primaria relacionada con la edad, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobar frontotemporal, enfermedad de grano argirofílico, tauopatía glial
20 globular, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/demencia parkinsoniana de Guam (CBD), demencia con cuerpos de Lewy, variante de cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

25 126. Un método de la reivindicación 124, en donde el anticuerpo se administra por inyección intravenosa en el cuerpo del sujeto.

127. Un método de la reivindicación 124, en donde el anticuerpo se administra directamente al cerebro del sujeto mediante inyección intracraneal o perforando un agujero a través del cráneo del sujeto.

128. Un método de la reivindicación 124, en donde el anticuerpo está marcado.

30 129. Un método de la reivindicación 128, en donde el anticuerpo está marcado con una etiqueta fluorescente, una etiqueta paramagnética o una etiqueta radiactiva.

130. Un método de la reivindicación 129, en donde la etiqueta radiactiva se detecta usando tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computada por emisión de fotón único (SPECT).

131. Un método de medición de la eficacia de un tratamiento en un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad asociada con la agregación o deposición de tau, que comprende

(a) medir un primer nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto antes del tratamiento administrando a un sujeto un anticuerpo definido por cualquiera de las reivindicaciones 1-84, y detectar una primera cantidad del anticuerpo unido a tau en el sujeto,

(b) administrar el tratamiento al sujeto,

(c) medir un segundo nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto después del tratamiento administrando a un sujeto el anticuerpo y detectando el anticuerpo unido a tau en el sujeto,

en donde una disminución en el nivel de depósitos de proteína tau indica una respuesta positiva al tratamiento.

132. Un método para medir la eficacia del tratamiento en un sujeto que está siendo tratado por una enfermedad asociada con la agregación o deposición de tau, que comprende

(a) medir un primer nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto antes del tratamiento administrando a un sujeto un anticuerpo definido por cualquiera de las reivindicaciones 1-84, y detectando una primera cantidad de anticuerpo unido a tau en el sujeto,

(b) administrar el tratamiento al sujeto,

(c) medir un segundo nivel de depósitos de proteína tau en el sujeto después del tratamiento administrando a un sujeto el anticuerpo y detectando una segunda cantidad de anticuerpo unido a tau en el sujeto,

en donde ningún cambio en el nivel de depósitos de proteína tau o un pequeño aumento en los depósitos de proteína tau indica una respuesta positiva al tratamiento.

159
RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a tau. Los anticuerpos inhibien o retrasan las patologías asociadas a tau y el deterioro sintomático asociado.

5

10

15

20

25