

ANTICUERPOS QUE RECONOCEN TAU

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica la prioridad de la Provisional Estadounidense No. 62/813,126, presentada el 3 de marzo de 2019, la Solicitud Provisional Estadounidense No. 62/813,137, presentada el 3 de marzo de 2019, y la Solicitud Provisional Estadounidense No. 62/838,159, presentada el 24 de abril de 2019, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad para todos los fines.

10

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Esta solicitud incluye un listado electrónico de secuencias en un archivo denominado 536323WO_ST25.TXT, creado el 24 de febrero de 2020 y que contiene
15 168,875 bytes, que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 **[0003]** 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
25 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)).

30 **[0004]** 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.

10 **[0005]** 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.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION REIVINDICADA**

15 **[0006]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a tau humana, que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende CDR-H1 que comprende SEQ ID NO: 8, CDR-H2 que
20 comprende SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 149, y CDR-H3 que comprende la SEQ ID NO: 10, en donde la región variable de la cadena pesada es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID NO: 18; y una región variable de cadena ligera madura que comprende CDR-L1 que comprende SEQ ID NO: 12, CDR-L2 que comprende SEQ ID NO: 150, 151, 153, 156, 158, 159, 160, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173 o 174, y CDR-L3
25 que comprende la SEQ ID NO: 14, en donde la región variable de la cadena ligera es al menos un 90% idéntica a la SEQ ID NO: 122.

[0007] En algunos anticuerpos, al menos una de las posiciones H12, H13, H17, H24, H40, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81 y H91 puede estar ocupada por V, K, T, A, R, Q, I, R, A, D, L, Q y F, respectivamente, y al menos una de las posiciones L2, L12, L15, L37, L39, L45, L60 y L100 puede estar ocupada por V, P, L, Q, R, R, D y Q respectivamente.

[0008] En algunos anticuerpos, CDR-L2 comprende SEQ ID NO: 150, 151, 163, 167, 168 o 169. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 110, 121, 122 o 123.

5 **[0009]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 110. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 121. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 122. En algunos anticuerpos, la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 123.

10 **[0010]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 146 y la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 94 o 122. En algunos anticuerpos, la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 94. En algunos anticuerpos, la región variable de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 122.

15 **[0011]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada comprende SEQ ID NO: 18 o 146 y la región variable de cadena ligera comprende SEQ ID NO: 122.

[0012] En otro 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, la posición H58 puede estar ocupada por V o I, y la posición H60 puede estar ocupada por D o E, 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, la posición L50 puede estar ocupada por L, E, D, G o V, la posición L52 puede estar ocupada por S o G, y la posición L54 puede estar ocupada por L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, en 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, H60 está ocupada por E, H82c está ocupada por V, L10 está ocupada por T, L17

está ocupada por E, L24 está ocupada por R, L37 está ocupada por Q, L47 está ocupada por G, N, D, E, P, T, S o A, L48 está ocupada por G o D, L49 está ocupada por E, L50 está ocupada por E, D, G, o V, L52 está ocupada por G, L54 está ocupada por D, G, N, E, Q, K, R, T, V, o S, L83 está ocupada por L, L86 está ocupada por H, L100 está ocupada por Q, L106 está ocupada por L.

[0013] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a tau humana que comprende tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 3D6, en donde 3D6 es un anticuerpo de ratón caracterizado por una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 11, excepto que la posición H27 puede estar ocupada por F o Y, la posición H28 puede estar ocupada por N o T, la posición H29 puede estar ocupada por I o F, la posición H30 puede estar ocupada por K o T, la posición H51 puede estar ocupada por I o V, la posición H54 puede estar ocupada por N o D, la posición H60 puede estar ocupada por D, A o E, la posición H61 puede estar ocupada por P o E, la posición H102 puede estar ocupada por F o Y, la posición L50 puede estar ocupada por L, E, D, G o V, la posición L52 puede estar ocupada por S o G, y la posición L54 puede estar ocupada por L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, donde al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido especificado: L37 está ocupada por Q, L47 está ocupada por G, N, D, E, P, T, S o A, L48 está ocupada por G o D, L49 está ocupada por E, L50 está ocupada por E, D, G o V, L52 está ocupada por G, L54 está ocupada por D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, L100 está ocupada por Q, H60 está ocupada por E, H82c está ocupada por V.

[0014] En algunos anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86. En algunos anticuerpos, CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 149. En algunos anticuerpos, CDR-L2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 150-175. En algunos anticuerpos, CDR-L1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89. En algunos anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 86 y CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 87. En

algunos 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: 88. En algunos 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. En algunos anticuerpos, CDR-H1 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 60. En algunos anticuerpos, CDR-H2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 149. En algunos anticuerpos, CDR-H3 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 65. En algunos anticuerpos, CDR-L2 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 150-175.

[0015] Algunos anticuerpos son un anticuerpo humanizado, un anticuerpo revestido o un anticuerpo quimérico.

[0016] Algunos anticuerpos comprenden 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.

[0017] Algunos anticuerpos comprenden una región variable de cadena pesada madura humanizada que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a cualquiera de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 146-148, y una región variable de cadena ligera madura humanizada que tiene un aminoácido secuencia al menos 90% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 93-145.

[0018] En algunos 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 anticuerpos, las posiciones H93 y H94 están ocupadas por S y T, respectivamente. En algunos anticuerpos, la posición H91 en la región VH está ocupada por F.

[0019] En algunos 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.

[0020] En algunos 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.

[0021] En algunos anticuerpos, la posición H58 en la región VH está ocupada por I.

[0022] En algunos 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.

[0023] En algunos 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.

[0024] En algunos 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, H60 está ocupada por D o E, 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, H82c está ocupada por L o V, 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.

[0025] En algunos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VH está ocupada por el aminoácido especificado: H10 está ocupada por E o D, H12 está ocupada por K o V, H13 está ocupada por K o R, H17 está ocupada por T, L o S, H24 está ocupada por V o A, H27 está ocupada por F o Y, H28 está ocupada por N o T, H29 está ocupada por I o F, H30 está ocupada por K o T, H38 está ocupada por Q o R, H40 está ocupada por A o R, H42 está ocupada por G o E, H43 está ocupada por K o Q, H48 está ocupada por M o I, H51 está ocupada por V o I, H54 está ocupada por N o D, H60 está ocupada por D, A o E, H61 está ocupada por P o E, H66 está ocupada por R o K, H67 está ocupada por V o A, H76 está ocupada por D o N, H80 está ocupada por M o L, H81 está ocupada por E o Q, H82a está ocupada por S o G, H82c está ocupada por L o V, H83 está ocupada por T o R, H91 está ocupada por Y o F, H93 está ocupada por A o S, H102 está ocupada por F o Y, H108 está ocupada por T o L, H109 está ocupada por L o V.

[0026] En algunos anticuerpos, las posiciones H91, H93 y H94 en la región VH están ocupadas por F, S y T, respectivamente.

[0027] 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.

[0028] En algunos anticuerpos, 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. 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.

- 5 **[0029]** En algunos anticuerpos, la posición H60 está ocupada por E. En algunos anticuerpos, la posición H82C está ocupada por V. En algunos anticuerpos, las posiciones H60, H80, H81, H82c y H83 están ocupadas por E, M, E, V y R, respectivamente.

- 10 **[0030]** En algunos 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.

- 15 **[0031]** En algunos 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, L47 es L, G, N, D, E, P, T, S o A, L48 es I, G o D, L49 es Y o E, L50 es L, E, D, G, o V, L52 es S o G, L54 es L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, L83 es L o V, L86 es H o Y, L100 es A o Q, L106 es L o I.

- 20 **[0032]** En algunos anticuerpos, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L2 es V o I, L7 es S o T, L12 es P o S, L15 es L o I, L36 es L, L37 es L o Q, L45 es R o K, L47 es L, G, N, D, E, P, T, S o A, L48 es I, G o D, L49 es Y o E, L50 es L, E, D, G o V, L52 es S o G, L54 es L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V, L60 es D o S, L100 es G o Q

- 25 **[0033]** 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.

- 30 **[0034]** En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por D. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por G. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por N. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por E.

En algunos anticuerpos, la posición L50 está ocupada por E. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por Q. En algunos anticuerpos, la posición L50 está ocupada por D. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por K. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por R anticuerpos, la posición L54 está ocupada por T. En algunos anticuerpos, la posición L50 está ocupada por G. En algunos anticuerpos, la posición L48 está ocupada por G. En algunos anticuerpos, la posición L48 está ocupada por D. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por G. En algunos anticuerpos, la posición L49 está ocupada por E. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por V. En algunos anticuerpos, la posición L54 está ocupada por S.

[0035] En algunos anticuerpos, la posición L52 está ocupada por G. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por N. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por D. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por E. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por P. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por T. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por S. En algunos anticuerpos, la posición L47 está ocupada por A. En algunos anticuerpos, la posición L50 está ocupada por V.

[0036] En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, G y R, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, G y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52 y L54 están ocupadas por Q, G y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52 y L54 están ocupadas por Q, G y R, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52 y L54 están ocupadas por Q, G y T, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52 y L54 están ocupadas por Q, G y D, respectivamente. En algunos anticuerpos, L37 y L54 están ocupados Q y R, respectivamente.

[0037] En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y D, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L50 están ocupadas por Q y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L50 están ocupadas por Q y D, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37

y L54 están ocupadas por Q y T, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L52 están ocupadas por Q y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y E, respectivamente. En algunos anticuerpos, en algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, D y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, D y R, respectivamente.

[0038] En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, E y G, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50 y L54 están ocupadas por Q, E y R, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50, L54 y L100 están ocupadas por Q, G, R y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50, L54 y L100 están ocupadas por Q, G, G y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52, L54 y L100 están ocupadas por Q, G, R y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L52, L54 y L100 están ocupadas por Q, G, D y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50, L54 y L100 están ocupadas por Q, D, G y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, posiciones L37, L50, L54 y L100 están ocupados por Q, D, R y Q, respectivamente.

[0039] En algunos anticuerpos, las posiciones L37, L50, L54 y L100 están ocupadas por Q, V, D y Q, respectivamente. En algunos anticuerpos, la posición L37 está ocupada por Q. En algunos anticuerpos, la posición L100 está ocupada por Q.

[0040] En algunos anticuerpos, la región variable de la 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 la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 83-85. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 146-148 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 93-145.

[0041] 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:

5 85.

[0042] En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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:

10

85.

[0043] En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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:

15

20

85.

[0044] En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y la región

25

30

variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

5 **[0045]** En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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. En algunos anticuerpos, 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 **[0046]** 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.

25 **[0047]** 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.

30 **[0048]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera

madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.

5 **[0049]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 122.

10 **[0050]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110.

15 **[0051]** En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94.

[0052] En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103.

20 **[0053]** Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, revestido o humanizado.

[0054] El anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto 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.

25

30

[0055] En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 176. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena pesada madura fusionada a una región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 178. Algunos anticuerpos comprenden además un péptido señal fusionado a la región variable madura de la cadena pesada y / o ligera. En algunos anticuerpos, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180. En algunos anticuerpos, la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 177. En algunos anticuerpos, la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179. En algunos anticuerpos, la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181. En algunos anticuerpos, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 178 y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179. En algunos anticuerpos, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180 y la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181.

[0056] 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.

[0057] En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0058] 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 este documento, un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico y una célula huésped transformada con el vector de expresión recombinante.

[0059] En algunos ácidos nucleicos, la cadena pesada está codificada por una secuencia que comprende SEQ ID NO: 182 y la cadena ligera está codificada por una secuencia que comprende SEQ ID NO: 183.

[0060] También se proporcionan métodos para producir anticuerpos, tales como un anticuerpo humanizado, quimérico o recubierto, por ejemplo, formas humanizadas, quiméricas o recubiertas de 3D6. En tales métodos, las células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se cultivan para que las células secreten el anticuerpo. A continuación, el anticuerpo puede purificarse del medio de cultivo celular.

[0061] Las líneas celulares que producen cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento se pueden producir mediante la introducción de un vector que codifica las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y un marcador seleccionable en las células, propagando las células en condiciones para seleccionar las células que tienen un mayor número de copias del vector, aislando una sola celdas de las celdas seleccionadas; y células en banco clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento de anticuerpo.

[0062] En otro aspecto, la invención comprende 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 este documento. En algunos vectores, el anticuerpo expresado es un scFv o un fragmento Fab. En algunos vectores, las una o más secuencias reguladoras incluyen una o más de un promotor, potenciador, sitio de unión a 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, una o más secuencias reguladoras incluyen un promotor eucariota. En algunos vectores, el ácido nucleico codifica además un gen seleccionable.

[0063] En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprenden incorporar los ácidos nucleicos

descritos en este documento en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

5 **[0064]** En otro aspecto más, la invención proporciona vectores primero y segundo que comprenden respectivamente ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura, cada uno unido operativamente a una o más secuencias reguladoras para efectuar la expresión de cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento, y una célula huésped que comprende los ácidos nucleicos. En algunos primeros y segundos vectores, los ácidos nucleicos codifican además respectivamente una región constante de cadena pesada fusionada a la región variable de cadena pesada madura y una región constante de
10 cadena ligera fusionada a la región variable de cadena ligera madura. En algunos primeros y segundos vectores, la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia de SEQ ID NO: 176 con o sin la lisina C-terminal y la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia de SEQ ID NO: 177.

15 **[0065]** En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero que comprenden incorporar cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento en el genoma de un animal transgénico, mediante el cual se expresa el anticuerpo.

20 **[0066]** También se proporcionan métodos para producir anticuerpos, tales como un anticuerpo humanizado, quimérico o recubierto. En tales métodos, las células transformadas con ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento se cultivan de modo que las células secreten el anticuerpo. A continuación, el anticuerpo puede purificarse del medio de cultivo celular.

25 **[0067]** 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 las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de la reivindicación 1 y un marcador seleccionable en las células, propagando las células en condiciones para seleccionar las células que tienen un mayor número de copias del vector, aislando células individuales
30 de las células seleccionadas y almacenando células clonadas a partir de una única célula seleccionada en función del rendimiento de anticuerpo.

[0068] Algunas células pueden propagarse en condiciones selectivas y seleccionarse en busca de líneas celulares que expresen y secreten naturalmente al menos 100 mg/L/10⁶ células/24 horas. Las células individuales se pueden aislar de las células seleccionadas. Las células clonadas a partir de una única célula pueden almacenarse. Pueden seleccionarse células individuales basándose en propiedades deseables, como el rendimiento del anticuerpo. Las líneas celulares ejemplares son líneas celulares que expresan 3D6 o versiones humanizadas de 3D6.

[0069] 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 ejemplares incluyen versiones humanizadas de 3D6.

[0070] 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 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 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.

[0071] 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.

[0072] 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 modo inducir la fagocitosis de tau.

5 **[0073]** 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.

[0074] También se proporcionan métodos para inhibir la formación de ovillos de tau que comprenden administrar un régimen eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento.

10 **[0075]** 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
15 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 demencia de
20 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
25 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).

30 **[0076]** 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.

[0077] 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.

[0078] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir un anticuerpo que se une específicamente a la tau humana en un epítipo dentro de un motivo de fórmula KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191) o KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194) que comprende inmunizar un animal con tau humana o un fragmento de la misma para producir anticuerpos y seleccionar un anticuerpo de los anticuerpos producidos que se une específicamente al motivo. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que consiste en los residuos KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191) o KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194) que comprenden inmunizar a un animal con tau o un fragmento de la misma para producir anticuerpos y cribado de un anticuerpo de los anticuerpos producidos que se une específicamente al péptido. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para producir un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191) que comprende inmunizar un animal con tau o un fragmento del mismo, y cribar anticuerpos que específicamente unirse al epítipo.

[0079] En algunos métodos, el animal se inmuniza con tau humana de 383 aminoácidos (4R0N). En algunos métodos, la tau humana contiene una mutación P301S. En algunos métodos, la tau humana está etiquetada con His en el extremo N-terminal recombinante.

5 **[0080]** En algunos métodos, el cribado determina la unión específica entre los anticuerpos y uno o más péptidos de hasta 15 aminoácidos que comprenden KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188), KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192), KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193) respectivamente o cualquier otro motivo consenso representado por KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). En algunos métodos, los uno o más péptidos
10 comprenden KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188) o KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192) o KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193) respectivamente. En algunos métodos, el animal se inmuniza con un fragmento tau de hasta 15 aminoácidos que comprende KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191), unido a un portador. En algunos métodos, el péptido es KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188) o KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192) o
15 KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0081] La Figura 1 representa los resultados de experimentos diseñados para
20 mapear el(los) epítipo(s) unidos por el anticuerpo monoclonal 3D6 murino.

[0082] La Figura 2 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
25 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
30 NO: 91. Los CDR definidos por el compuesto de Kabat/Chothia están en negrita.

[0083] La Figura 3 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 aceptador 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.

[0084] Las Figuras 4A, 4B y 4C representan los resultados de los ensayos de selección ELISA para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

[0085] La Figura 5 representa la cinética de unión para anticuerpos anti-tau monoclonales de ratón seleccionados para tau humana recombinante.

[0086] La Figura 6 muestra los resultados de los ensayos de bloqueo funcional para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

[0087] La Figura 7 representa los resultados de los ensayos de desagregación para anticuerpos monoclonales anti-tau de ratón seleccionados.

[0088] La Figura 8 muestra los resultados de experimentos que muestran el tau de inmunocaptura 3D6 y 5G8 del tejido de la enfermedad de Alzheimer humano.

[0089] Las Figuras 9A y 9B muestran alineaciones de la región variable de la cadena pesada de 3D6 murino (SEQ ID NO: 7) y de versiones humanizadas del anticuerpo 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6, hu3D6VHvb7, hu3D6VHv1bA11, h3D6VHvb8 y h3D6VHvb9) con la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la línea germinal humana IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) y con la secuencia de la región variable de la 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, hu3D6VHv1bA11 es la SEQ ID NO: 18, h3D6VHvb8 es la SEQ ID NO: 146 y h3D6VHvb9 es la SEQ ID NO: 148. Los residuos idénticos a los de la región variable de la cadena pesada de 3D6 murino (SEQ ID NO: 7) se indican con “.”. Las CDR definidas por el Compuesto de Kabat/Chothia están en negritas.

[0090] Las figuras 10A, 10B, 10C y 10D muestran alineaciones de la región variable de la cadena ligera de versiones humanizadas del anticuerpo 3D6: hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), y hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138). Los residuos idénticos a los de la región variable de cadena ligera de hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21) se indican con “.”. Las CDR definidas por Rabat están en negritas.

[0091] La Figura 11 muestra los resultados del ensayo de internalización de tau para variantes de 3D6 humanizadas seleccionadas.

[0092] Las Figuras 12A y 12B muestran los resultados de experimentos de microseries de mapeo de sustitución. La Figura 12A muestra un gráfico del efecto de sustitución, y la Figura 12B muestra una alineación de porciones de las repeticiones de unión de microtúbulos de tau con residuos importantes para la unión de 3D6. Los aa 255-271 resaltados son SEQ ID NO: 184, los aa 286-302 son SEQ ID NO: 185, los aa 317-333 son SEQ ID NO: 186, y los aa 349-365 son SEQ ID NO: 187.

[0093] La Figura 13 muestra los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica que muestran que 3D6 se une a tau en tejido normal (panel superior) y de la enfermedad de Alzheimer (paneles central e inferior).

5 **[0094]** La Figura 14 muestra los resultados de los experimentos de espectrometría de masas para evaluar la unión de estequiometría de 3D6.

[0095] La Figura 15 muestra que 3D6 interrumpe la siembra de tau en un modelo de enfermedad *in vivo* de enfermedad de Alzheimer.

10 **[0096]** La Figura 16 muestra que las variantes humanizadas 3D6 hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 y hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 bloquean la interacción entre tau y heparina.

[0097] La Figura 17 muestra que las variantes humanizadas 3D6 hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 y hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 se unen a formas fibrilares de tau.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

15 **[0098]** SEQ ID NO:1 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-8).

[0099] SEQ ID NO:2 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-7).

20 **[00100]** SEQ ID NO:3 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-6), (4R0N human tau).

[00101] SEQ ID NO:4 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-5)

[00102] SEQ ID NO:5 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-4).

25 **[00103]** SEQ ID NO:6 establece la secuencia de aminoácidos de una tau humana isoforme (Prot. Suizo P10636-2).

[00104] SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 de ratón.

30 **[00105]** SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat/Chothia composite CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00106] SEQ ID NO:9 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del

anticuerpo 3D6 de ratón.

[00107] SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

5 **[00108]** 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.

[00109] SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L1 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

[00110] SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L2 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

10 **[00111]** SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-L3 del anticuerpo 3D6 de ratón y del anticuerpo 6A10 de ratón.

[00112] SEQ ID NO:15 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1.

15 **[00113]** SEQ ID NO:16 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv2.

[00114] SEQ ID NO:17 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1b.

[00115] SEQ ID NO:18 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11.

20 **[00116]** SEQ ID NO:19 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv5:

[00117] SEQ ID NO:20 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv1.

25 **[00118]** SEQ ID NO:21 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv2.

[00119] SEQ ID NO:22 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv3.

[00120] SEQ ID NO:23 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VLv4.

30 **[00121]** SEQ ID NO:24 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. BAC01986.1.

[00122] SEQ ID NO:25 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGHV1-69-2*01.

[00123] SEQ ID NO:26 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT No. IGKJ1*01.

5 **[00124]** SEQ ID NO:27 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKV2-30*02

[00125] SEQ ID NO:28 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No. IGKJ2*01.

10 **[00126]** SEQ ID NO:29 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc. No. AAZ09048.1.

[00127] SEQ ID NO: 30 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00128] SEQ ID NO: 31 establece una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3D6 de ratón.

15 **[00129]** SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00130] SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de aminoácidos de Chothia CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

20 **[00131]** SEQ ID NO: 34 establece la secuencia de aminoácidos de Chothia CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00132] SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de aminoácidos de AbM CDR-H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00133] SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

25 **[00134]** SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00135] SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-L3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

30 **[00136]** SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-H1 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00137] SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-

H2 del anticuerpo 3D6 de ratón.

[00138] SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de aminoácidos de Contact CDR-H3 del anticuerpo 3D6 de ratón.

5 **[00139]** 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).

10 **[00140]** 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).

[00141] 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).

15 **[00142]** SEQ ID NO:45 establece la secuencia de aminoácidos de consenso entre 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).

[00143] SEQ ID NO:46 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11B6G2.

20 **[00144]** SEQ ID NO:47 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1bA11B6H3.

[00145] SEQ ID NO:48 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1c.

25 **[00146]** SEQ ID NO:49 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1d.

[00147] SEQ ID NO:50 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1e.

[00148] SEQ ID NO:51 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv1f.

30 **[00149]** SEQ ID NO:52 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3.

[00150] SEQ ID NO:53 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3b.

[00151] SEQ ID NO:54 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv3c.

5 **[00152]** SEQ ID NO:55 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4.

[00153] SEQ ID NO:56 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4b.

10 **[00154]** SEQ ID NO:57 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3D6 humanizado hu3D6VHv4c.

[00155] 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).

15 **[00156]** 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).

[00157] 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).

20 **[00158]** SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1bA11B6G2).

[00159] 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).

25 **[00160]** 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).

[00161] SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H2 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1e).

30 **[00162]** SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos de un Kabat alterno CDR-H3 de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VHv1f).

[00163] SEQ ID NO:66 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6A10 de ratón.

[00164] SEQ ID NO: 67 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat/Chothia composite CDR-H1 del anticuerpo 6A10 de ratón.

5 **[00165]** SEQ ID NO:68 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H2 del anticuerpo 6A10 de ratón.

[00166] SEQ ID NO: 69 establece la secuencia de aminoácidos de Kabat CDR-H3 del anticuerpo 6A10 de ratón.

10 **[00167]** 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.

[00168] SEQ ID NO:71 establece la secuencia de aminoácidos de consenso entre las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos 3D6 humanizados seleccionados (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, 15 VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, y VHv5) (marcados “Mayoría” en la Figuras 4A y 4B de PCT/IB2017/052544).

[00169] SEQ ID NO: 72 establece la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo 3D6 quimérico.

20 **[00170]** SEQ ID NO: 73 establece la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo 3D6 quimérico.

[00171] SEQ ID NO:74 establece la secuencia de aminoácidos del modelo estructural variable de cadena pesada Acc.No. 5MYX-VH_mSt.

[00172] SEQ ID NO:75 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena pesada Acc.No. 2RCS-VH_huFrwk.

25 **[00173]** SEQ ID NO:76 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1.

[00174] SEQ ID NO:77 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2.

30 **[00175]** SEQ ID NO:78 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3.

[00176] SEQ ID NO:79 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable

de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4.

[00177] SEQ ID NO:80 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5.

[00178] SEQ ID NO:81 establece la secuencia de aminoácidos del modelo estructural variable de cadena ligera Acc.No. 5MYX-VL_mSt.

[00179] SEQ ID NO:82 establece la secuencia de aminoácidos del aceptor variable de cadena ligera Acc.No. ARX71335-VL_huFrwk.

[00180] SEQ ID NO:83 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1.

10 **[00181]** SEQ ID NO:84 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2.

[00182] SEQ ID NO:85 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3.

[00183] SEQ ID NO:86 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H1 de
15 Compuesto de Kabat-Chothia alterno de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb4 y hu3D6VHvb5).

[00184] SEQ ID NO:87 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alterno de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb3 y hu3D6VHvb4).

20 **[00185]** SEQ ID NO:88 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alterno de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb5).

[00186] SEQ ID NO:89 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L1 de Kabat alterno de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VLvb3).

[00187] SEQ ID NO:90 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable
25 de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6.

[00188] SEQ ID NO:91 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7.

[00189] SEQ ID NO:92 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alterno de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb6 y
30 hu3D6VHvb7).

[00190] SEQ ID NO:93 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable

de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54D.

[00191] SEQ ID NO:94 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54G.

5 **[00192]** SEQ ID NO:95 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L45N.

[00193] SEQ ID NO:96 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54E.

[00194] SEQ ID NO:97 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L50E.

10 **[00195]** SEQ ID NO:98 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54Q.

[00196] SEQ ID NO:99 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L50D.

15 **[00197]** SEQ ID NO:100 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54K.

[00198] SEQ ID NO:101 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54R.

[00199] SEQ ID NO:102 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54T.

20 **[00200]** SEQ ID NO:103 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L50G.

[00201] SEQ ID NO:104 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante I48G.

25 **[00202]** SEQ ID NO:105 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante I48D.

[00203] SEQ ID NO:106 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47G.

[00204] SEQ ID NO:107 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante Y49E.

30 **[00205]** SEQ ID NO:108 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54V.

[00206] SEQ ID NO:109 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L54S.

[00207] SEQ ID NO:110 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante S52G.

5 **[00208]** SEQ ID NO:111 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47N.

[00209] SEQ ID NO:112 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47D.

10 **[00210]** SEQ ID NO:113 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47E.

[00211] SEQ ID NO:114 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47P.

[00212] SEQ ID NO:115 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47T.

15 **[00213]** SEQ ID NO:116 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47S.

[00214] SEQ ID NO:117 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L47A.

20 **[00215]** SEQ ID NO:118 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L50V.

[00216] SEQ ID NO:119 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50G_L54R.

[00217] SEQ ID NO:120 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50G_L54G.

25 **[00218]** SEQ ID NO:121 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54G.

[00219] SEQ ID NO:122 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R.

30 **[00220]** SEQ ID NO:123 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54T.

[00221] SEQ ID NO:124 establece la secuencia de aminoácidos de la región

variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54D.

[00222] SEQ ID NO:125 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L54R.

[00223] SEQ ID NO:126 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L54G.

[00224] SEQ ID NO:127 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L54D.

[00225] SEQ ID NO:128 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50G.

[00226] SEQ ID NO:129 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50D.

[00227] SEQ ID NO:130 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L54T.

[00228] SEQ ID NO:131 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G.

[00229] SEQ ID NO:132 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50D_L54G.

[00230] SEQ ID NO:133 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50D_L54R.

[00231] SEQ ID NO:134 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50E_L54G.

[00232] SEQ ID NO:135 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50E_L54R.

[00233] SEQ ID NO:136 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50G_L54R_G100Q.

[00234] SEQ ID NO:137 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_L50G_L54G_G100Q.

[00235] SEQ ID NO:138 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R_G100Q.

[00236] SEQ ID NO:139 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54D_G100Q.

[00237] SEQ ID NO:140 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante L37Q_L50D_L54G_G100Q.

[00238] SEQ ID NO:141 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante L37Q_L50D_L54R_G100Q.

5 **[00239]** SEQ ID NO:142 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante L37Q_L50V_L54D_G100Q.

[00240] SEQ ID NO:143 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante L37Q.

[00241] SEQ ID NO:144 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante G100Q.

[00242] SEQ ID NO:145 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un Hu3D6VLv2 variante L37Q_L54E.

[00243] SEQ ID NO:146 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un hu3D6VHv1bA11 variante D60E, también conocido
15 como h3D6VHvb8.

[00244] SEQ ID NO:147 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un hu3D6VHv1bA11 variante L82cV.

[00245] SEQ ID NO:148 establece la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un hu3D6VHv1bA11 variante
20 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R, también conocido como h3D6VHvb9.

[00246] SEQ ID NO:149 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 de Kabat alterno de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en h3D6VHvb8 y en h3D6VHvb9).

[00247] SEQ ID NO:150 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alterno de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54D y en
25 hu3D6VLv2 L37Q_L54D).

[00248] SEQ ID NO:151 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alterno de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54G y en hu3D6VLv2 L37Q_L54G).

30 **[00249]** SEQ ID NO:152 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alterno de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54N).

[00250] SEQ ID NO:153 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54E y en hu3D6VLv2 L37Q_L54E).

5 **[00251]** SEQ ID NO:154 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50E).

[00252] SEQ ID NO:155 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54Q).

10 **[00253]** SEQ ID NO:156 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50D y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D).

[00254] SEQ ID NO:157 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54K).

15 **[00255]** SEQ ID NO:158 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54R y en hu3D6VLv2 L37Q_L54R).

[00256] SEQ ID NO:159 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54T y en hu3D6VLv2 L37Q_L54T).

20 **[00257]** SEQ ID NO:160 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50G y en hu3D6VLv2 L37Q_L50G).

[00258] SEQ ID NO:161 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54V).

25 **[00259]** SEQ ID NO:162 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54S).

[00260] SEQ ID NO:163 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 S52G y en hu3D6VLv2 L37Q_S52G).

30 **[00261]** SEQ ID NO:164 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50V).

[00262] SEQ ID NO:165 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R and hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q).

5 **[00263]** SEQ ID NO:166 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G y en and in hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q).

[00264] SEQ ID NO:167 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G).

10 **[00265]** SEQ ID NO:168 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R y en and in hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q).

[00266] SEQ ID NO:169 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2
15 L37Q_S52G_L54T).

[00267] SEQ ID NO:170 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D y en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q).

[00268] SEQ ID NO:171 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de
20 Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q).

[00269] SEQ ID NO:172 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q).

25 **[00270]** SEQ ID NO:173 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G).

[00271] SEQ ID NO:174 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2
30 L37Q_L50E_L54R).

[00272] SEQ ID NO:175 establece la secuencia de aminoácidos de un CDR-L2 de Kabat alternativo de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q).

5 **[00273]** SEQ ID NO:176 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada (IgG1: alotipo G1m17,1)

[00274] SEQ ID NO:177 establece la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera (kappa)

[00275] SEQ ID NO:178 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada madura de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 alotipo)

10 **[00276]** SEQ ID NO:179 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera madura de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa)

[00277] SEQ ID NO:180 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 alotipo) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el terminal N

[00278] SEQ ID NO:181 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el terminal N.

20 **[00279]** SEQ ID NO:182 establece la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 alotipo) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el terminal N

[00280] SEQ ID NO:183 establece la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de un 3D6 humanizado variante (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el terminal N

25 **[00281]** SEQ ID NO:184 establece la secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 1 (residuos de aminoácidos 255-271 of SEQ ID NO:1)

[00282] SEQ ID NO:185 establece la secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 2 (residuos de aminoácidos 286-302 of SEQ ID NO:1)

30

[00283] SEQ ID NO:186 establece la secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 3 (residuos de aminoácidos 317-333 of SEQ ID NO:1)

5 **[00284]** SEQ ID NO:187 establece la secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 4 (residuos de aminoácidos 349-365 of SEQ ID NO:1)

[00285] SEQ ID NO:188 establece la secuencia de aminoácidos de un motivo central de tau en MBTR 1 unido por 3D6

10 **[00286]** SEQ ID NO:189 establece la secuencia de aminoácidos de la secuencia de tau en el terminal N al motivo central de tau en MBTR 1 unido por 3D6

[00287] SEQ ID NO:190 establece la secuencia de aminoácidos of tau sequence C-terminal to core motif of tau in MBTR 1 unido por 3D6

[00288] SEQ ID NO:191 establece la secuencia de aminoácidos del epítipo de 3D6

15 **[00289]** SEQ ID NO:192 establece la secuencia de aminoácidos de un motivo central de tau en MBTR 2 unido por 3D6

[00290] SEQ ID NO:193 establece la secuencia de aminoácidos de un motivo central de tau en MBTR 3 unido por 3D6

[00291] SEQ ID NO:194 establece la secuencia de aminoácidos de un motivo central de tau en MBTR 4 unido por 3D6

20

DEFINICIONES

[00292] 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 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 meenredo, un anticuerpo

25

30

monoclonal aislado u otra entidad biológica es la especie macromolecular predominante que permanece después de su purificación.

5 **[00293]** La unión específica de un anticuerpo a su antígeno objetivo significa una afinidad y/o aidez 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 fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión
10 específica no necesariamente implica que un anticuerpo se una a un solo objetivo.

15 **[00294]** 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). 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 variable de cadena ligera sin el péptido
20 señal de cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

25 **[00295]** 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 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., 2ª ed. Raven Press, N.Y., 1989, cap. 7 (incorporado por referencia en su totalidad a todos los efectos).

30 **[00296]** 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 epítopo 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.

[00297] 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.

5 **[00298] 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.

15 **[00299]** 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 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.

[00300] 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 transcitosis 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).

[00301] 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-IgTM) 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), IgG1 (Xencor) diseñada por Fc o DuoBody (basada en intercambio de rama Fab, Genmab).

10 **[00302]** 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 desnaturizantes, 15 mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario (también conocidos como epítopos conformacionales) se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. 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. 20 (1996).

25 **[00303]** 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 30 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.

5 **[00304]** 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 compete 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 epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para el impedimento estérico que se produzca.

15 **[00305]** 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.

[00306] El término “paciente” incluye humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

20 **[00307]** 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.

25 **[00308]** 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.

30

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

5 **[00309]** 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.

10 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

15 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.

20 **[00310]** 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.

25 **[00311]** 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.

30 **[00312]** 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.

[00313] 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.

[00314] 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.

[00315] 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. Cuando la divulgación se refiere a una característica que comprende elementos específicos, la divulgación debería ser alternativamente comprendida como que se refiere a la característica que consiste esencialmente en o que consiste en los elementos especificados.

[00316] 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.

[00317] 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.

[00318] Relevancia estadística significa $p \leq 0.05$.

- 5 **[00319]** 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.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

- 15 **[00320]** La invención proporciona anticuerpos que se unen a tau. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo o epítopos dentro de la región de la región de unión a microtúbulos (MTBR) de la tau humana definida por aproximadamente los residuos 244 a 372 de SEQ ID NO: 1. Debido a que la región MTBR contiene repeticiones de secuencia, un solo anticuerpo puede unirse en múltiples sitios repetidos dentro de esta región. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo de
- 20 KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Algunos anticuerpos se unen dentro de los residuos 199-213 y/o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen dentro de los residuos 259-268 y/o 290-299 y/o 321-330 y/o 353-362 de SEQ ID NO: 1. En algunos anticuerpos, la unión a la región MTBR 4 en los residuos 353-362 es más débil
- 25 que la unión a los MTBR 1, 2 y 3. 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
- 30 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

[00321] 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)

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

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAAEEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTPP	TREPCKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSKS	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGQSVQIV	YKPVDSLKVT	SKCGSLGNIH
310	320	330	340	350	360
HKPGGGQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
370	380	390	400	410	
AEIVYKSPVV	SGDTSRHL	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL

P10636-6 (4R0N tau humana) (SEQ ID NO:3)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPCKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
250	260	270	280	290	300
HVPGGGQVQI	VYKPVDSLKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDKDR	RVQSKIGSLD
310	320	330	340	350	360
NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKAKTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSRHL	SNVSSTGSID
370	380				
MVDSPQLATL	ADEVASLAK	QGL			

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
130	140	150	160	170	180
HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK
190	200	210	220	230	240
TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPCKVAVVR	TPPKSPSSAK
250	260	270	280	290	300
SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
310	320	330	340	350	360
PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFREN	AKAKTDHGAE
370	380	390	400	410	
IVYKSPVVS	DTSPRHL	SSTGSIDMVD	SPQLATLADE	VSASLAKQGL	

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
70	80	90	100	110	120
SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
130	140	150	160	170	180
KIATPRGAAP	PGQKGQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
190	200	210	220	230	240
SRTPSLPTPP	TREPCKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSKK	IGSTENLKHQ
250	260	270	280	290	300
PGGGKVQIVY	KPVDLSKVT	KCGSLGNIH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRV	QSKIGSLDNI
310	320	330	340	350	360
THVPGGGNKK	IETHKLTFR	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
370	380				
DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L			

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10	20	30	40	50	60
MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
70	80	90	100	110	120
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA
130	140	150	160	170	180
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPCKVAV	VRTPPKSPSS
190	200	210	220	230	240
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVDLSKVT	SKCGSLGNIH
250	260	270	280	290	300
HKPGGGQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
310	320	330	340	350	
AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVASLAKQ	GL

[00322] 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

5 enfermedad, parálisis 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

10 272 (G272V); una mutación de 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 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).

[00323] 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. 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

A. *Especificidad de unión y propiedades funcionales*

[00324] La invención proporciona anticuerpos que se unen a tau. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Algunos anticuerpos se unen a un péptido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en los residuos de aminoácidos 259-268 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen a un péptido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en residuos de aminoácidos 290-299 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen a un péptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos de aminoácidos 321-330 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos

anticuerpos se unen a un péptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en los residuos de aminoácidos 353-362 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen a dos, tres o los cuatro de estos péptidos. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 199-213 de la proteína tau humana 4R0N de 383 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) (correspondiente a los residuos 257-271 de SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 262-276 de la proteína tau humana 4R0N de 383 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) (correspondientes a los residuos 320-334 de SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 257-271 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 320-334 de la proteína tau de 441 aminoácidos (SEQ ID NO: 1). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 259-268 de la proteína tau de 441 aminoácidos SEQ ID NO: 1, a saber, KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 290-299 de la proteína tau de 441 aminoácidos SEQ ID NO: 1, a saber, KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 321-330 de la proteína tau de 441 aminoácidos SEQ ID NO: 1, a saber, KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consta de los residuos 353-362 de la proteína tau de 441 aminoácidos SEQ ID NO: 1, a saber, KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194). Algunos anticuerpos de la invención se unen específicamente a un péptido que consiste en el motivo consenso KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Algunos anticuerpos se unen a un epítipo que comprende los residuos 259, 262, 265, 267, 268, los residuos 290, 293, 296, 298, 299, los residuos 321, 324, 327, 329, 330 o los residuos 353, 356, 359, 362 de proteína tau de 441 aminoácidos SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen a tau independientemente del estado de fosforilación. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo que no incluye un residuo sujeto a fosforilación. Estos anticuerpos se pueden obtener inmunizando con un polipéptido tau purificado de una fuente natural o expresado de forma recombinante. Los anticuerpos se pueden cribar para unir 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 veces a la tau fosforilada en comparación con la tau no fosforilada (es decir, son "específicas de pan").

5 3D6 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal específico de pan. La invención también proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anteriores, tales como, por ejemplo, el epítipo de 3D6. También se incluyen anticuerpos que compiten por unirse a tau con cualquiera de los anticuerpos anteriores, como, por ejemplo, que compiten con 3D6.

10 **[00325]** Los anticuerpos mencionados anteriormente se pueden generar de nuevo inmunizando con un péptido que incluye, que consiste esencialmente en o que consiste en los residuos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1) o inmunizando con un péptido que incluye, que consiste esencialmente en o que consiste en los residuos 259-268, 290-
15 299, 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, o inmunizando con un polipéptido tau de longitud completa o un fragmento del mismo que comprende dichos residuos y el cribado de la unión específica a un péptido que incluye dichos residuos. Dichos péptidos se unen preferiblemente a una molécula conjugada heteróloga que ayuda a provocar una respuesta de anticuerpos al péptido. La unión puede ser directa o mediante un péptido
20 espaciador o un aminoácido. La cisteína se utiliza como aminoácido espaciador porque su grupo SH libre facilita la unión de una molécula portadora. También se puede usar un enlazador de poliglicina (por ejemplo, 2-6 glicinas), con o sin un residuo de cisteína entre las glicinas y el péptido. La molécula portadora sirve para proporcionar un epítipo de células T que ayuda a provocar una respuesta de anticuerpos contra el péptido. Se
25 utilizan habitualmente varios vehículos, en particular hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina y albúmina de suero bovino (BSA). Pueden añadirse espaciadores peptídicos al inmunógeno peptídico como parte de la síntesis de péptidos en fase sólida. Los portadores se añaden típicamente mediante reticulación química. Algunos ejemplos de reticulantes químicos que se pueden utilizar incluyen el éster cruzado de N-maleimido-
30 6-aminocaproilo o el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) (véase, por ejemplo, Harlow, E. et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1988; Sinigaglia et al., *Nature*, 336: 778-780 (1988); Chicz et al., *J. Exp. Med.* 178:27-47 (1993); Hammer et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al. *Immunogenetics*, 39: 230-242 (1994); WO 98/23635; y Southwood et al. *J. Immunology*, 160: 3363 - 3373 (1998)). El portador y el espaciador, si están
 5 presentes, se pueden unir a cualquier extremo del inmunógeno.

[00326] Puede usarse un péptido con espaciador y portador opcionales para inmunizar animales de laboratorio o células B como se describe con más detalle a continuación. Los sobrenadantes de hibridoma se pueden probar para determinar su capacidad para unirse a uno o más péptidos que incluyen, que consisten esencialmente
 10 en o que consisten en los residuos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1), o incluyendo, que consiste esencialmente en o que consiste en los residuos 259-268, 290-299, 321-330, o 353-362 de SEQ ID NO: 1, y/o formas fosforiladas y no fosforiladas de tau, tales como, por ejemplo, una isoforma de longitud completa de tau con la posición
 15 404 en forma fosforilada. El péptido se puede unir a un portador u otra etiqueta para facilitar el ensayo de selección. En este caso, el portador o etiqueta es preferentemente diferente de la combinación de espaciador y molécula portadora utilizada para la inmunización para eliminar anticuerpos específicos del espaciador o portador en lugar del péptido tau. Puede usarse cualquiera de las isoformas de tau.

[00327] La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a epítomos dentro de tau. Un anticuerpo designado 3D6 es uno de tales anticuerpos de ratón ejemplares. A menos que sea evidente por 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
 25 [NÚMERO DE DEPÓSITO] Este anticuerpo se une específicamente a un epítopo de KXXSXXNX(K/H)H (SEQ ID NO: 191). Este anticuerpo se une específicamente a los residuos de aminoácidos 199-213 y/o 262-276 de la proteína tau humana 4R0N de 383 aminoácidos (SEQ ID NO: 3) (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 y/o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1). El anticuerpo se une específicamente
 30 a los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, y combinaciones de cualquiera de los 2, 3 o los cuatro de los mismos. Este anticuerpo

se caracteriza además por su capacidad para unirse tanto a tau fosforilada como no fosforilada, a formas y conformaciones tanto patológicas como no patológicas de tau, y formas mal plegadas/agregadas de tau. Un anticuerpo designado 6A10 es uno de tales anticuerpos de ratón ejemplares. A menos que sea evidente por 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 denominan SEQ ID NO: 67, 68 y 69, respectivamente, y las CDR de Kabat de la cadena ligera de 6A10 se denominan 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.

[00328] Algunos anticuerpos de la invención se unen al mismo epítipo o al epítipo superpuesto que un anticuerpo designado 3D6. Las secuencias de las regiones variables maduras de cadena pesada y ligera de este anticuerpo se denominan SEQ ID NO: 7 y 11, respectivamente. Se pueden producir otros anticuerpos que tienen tal especificidad de unión inmunizando ratones con tau o una porción de la misma, que incluye, consiste esencialmente en o consiste en el epítipo deseado (por ejemplo, 199-213 y/o 262-276 de SEQ ID NO: 3, correspondiente a residuos 257-271 y/o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1; o por ejemplo, 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, cualquier combinación de 2, 3 o los 4 de los mismos) y cribado de los anticuerpos resultantes para la unión a tau opcionalmente en competencia con un anticuerpo. que tiene las regiones variables del 3D6 de ratón (IgG1 kappa). Los fragmentos de tau que incluyen el epítipo deseado pueden unirse a un portador que ayude a provocar una respuesta de anticuerpo al fragmento y/o combinarse con un adyuvante que ayude a provocar dicha respuesta. Dichos anticuerpos pueden cribarse para determinar la unión diferencial a tau o un fragmento de la misma en comparación con mutantes de residuos especificados. El cribado contra tales mutantes define con mayor precisión la especificidad de unión para permitir la identificación de anticuerpos cuya unión se inhibe por mutagénesis de residuos particulares y que es probable que compartan las propiedades funcionales de otros anticuerpos ejemplificados. Las mutaciones pueden ser una sustitución de sustitución sistemática con alanina (o serina si ya está presente

una alanina) un residuo a la vez, o intervalos más espaciados, a lo largo del objetivo o en una sección de la misma en la que se sabe que reside un epítipo. Si el mismo conjunto de mutaciones reduce significativamente la unión de dos anticuerpos, los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo.

- 5 **[00329]** Los anticuerpos que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (por ejemplo, 3D6) también se pueden producir usando una variante del método de presentación en fagos. Ver Winter, WO 92/20791. Este método es particularmente adecuado para producir anticuerpos humanos. En este método, la región variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se usa como
- 10 material de partida. Si, por ejemplo, se selecciona una región variable de cadena ligera como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la que los miembros muestran la misma región variable de cadena ligera (es decir, el material de partida murino) y una región variable de cadena pesada diferente. Las regiones variables de
- 15 cadena pesada se pueden obtener, por ejemplo, de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humana reorganizadas. Se selecciona un fago que muestra una fuerte unión específica para tau o un fragmento del mismo (por ejemplo, al menos 10^8 y preferiblemente al menos $10^9 M^{-1}$). La región variable de la cadena pesada de este fago sirve entonces como material de partida para construir una biblioteca de fagos adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de cadena pesada (es
- 20 decir, la región identificada de la primera biblioteca de presentación) y una región variable de cadena ligera diferente. Las regiones variables de cadena ligera se pueden obtener, por ejemplo, de una biblioteca de regiones de cadena ligera variable humana reorganizadas. De nuevo, se seleccionan los fagos que muestran una fuerte unión específica para tau o un fragmento del mismo. Los anticuerpos resultantes normalmente
- 25 tienen la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

[00330] Las CDR compuestas de Kabat/Chothia de la cadena pesada de 3D6 se denominan SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las CDR de Kabat de la cadena ligera de 3D6 se denominan SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente.

- [00331]** La Tabla 2 indica los CDR de 3D6 definidos por Kabat, Chothia, Compuesto
- 30 de Chothia y Kabat (también referido aquí como “Compuesto de Kabat/Chothia”), AbM y Contacto.

[00332] 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

[00333] 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 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.

[00334] 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), delecciones o inserciones.

[00335] 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 No Humanos

[00336] La producción de otros anticuerpos no humanos, por ejemplo, murino, cobaya, primate, conejo o rata, contra tau o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3, correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1; o los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1) se pueden lograr mediante , por ejemplo, inmunizar al animal con tau o un fragmento de la misma. Ver Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (incorporado como referencia para todos los propósitos). Dicho inmunógeno se puede

obtener de una fuente natural, mediante síntesis de péptidos o mediante expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno se puede administrar fusionado o complejoado de otro modo con una proteína transportadora. Opcionalmente, el inmunógeno se puede administrar con un adyuvante. Se pueden usar varios tipos de adyuvantes como se describe a continuación. Se prefiere el adyuvante completo de Freund seguido de un adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio. Los conejos o cobayas se utilizan típicamente para fabricar anticuerpos policlonales. Los ratones se utilizan normalmente para fabricar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se examinan para determinar la unión específica a tau o un epítipo dentro de tau (por ejemplo, un epítipo que comprende uno o más de los residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3; correspondiente a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO : 1 o un epítipo que comprende uno o más de los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1). Dicho cribado se puede lograr determinando la unión de un anticuerpo a una colección de variantes de tau, como las variantes de tau que contienen los residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320 -334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1) o variantes de tau que contienen los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, o mutaciones dentro de estos residuos, y determinar qué las variantes de tau se unen al anticuerpo. La unión se puede evaluar, por ejemplo, mediante transferencia Western, FACS o ELISA.

C. Anticuerpos Humanizados

[00337] 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 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 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 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 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 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 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)*”

5 (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

10 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

15 100% 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

20 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

25 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

30 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”.

[00338] 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).

[00339] 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
5 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
10 reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

[00340] 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)
15 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.

[00341] Algunos anticuerpos humanizados y quiméricos tienen las mismas (dentro del error experimental) o propiedades funcionales mejoradas, por ejemplo, afinidad de unión por tau humana, inhibición de internalización DE tau en neuronas como se describe
20 en los ejemplos como un anticuerpo murino del que se derivaron. Por ejemplo, algunos anticuerpos humanizados y quiméricos tienen una afinidad de unión dentro de un factor de 3, 2 o 1 del anticuerpo murino del que se derivaron o una afinidad indistinguible dentro del error experimental. Algunos anticuerpos humanizados y quiméricos inhiben la internalización de tau en neuronas como se describe en los ejemplos dentro de un factor
25 de 3, 2 o 1 del anticuerpo murino del que se derivaron o inhiben el mismo dentro de un error experimental que el anticuerpo de ratón del que se derivaron. Algunos anticuerpos humanizados exhiben inmunogenicidad reducida, mayor afinidad, mayor termoestabilidad y/o expresión mejorada en relación con las formas humanizadas previamente descritas del anticuerpo 3D6 (ver WO 2017/191560), hu3D6VHv1bA11/L2-
30 DIM4 demostró afinidad mejorada, como lo evidencias los números de tasa, fuera de

tasa y Kd, sobre el hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 demostró mayor termoestabilidad y título sobre hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 parental.

[00342] 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. Un 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. Un 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.

[00343] 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 aceptadores 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.

[00344] 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.

[00345] 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.

[00346] 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).

[00347] 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)).

[00348] 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.

[00349] 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.

[00350] Los ejemplos de anticuerpos humanizados son formas humanizadas del 3D6 de ratón, designado Hu3D6.

[00351] El anticuerpo de ratón 3D6 comprende regiones variables maduras de cadena pesada y ligera que tienen secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11, respectivamente. La invención proporciona formas humanizadas del anticuerpo 3D6 murino que incluyen 10 regiones variables maduras de cadena pesada humanizadas 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), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91), hu3D6VHv1bA11 D60E (hu3D6VHvb8, SEQ ID NO: 146), hu3D6VHv1bA11

L82cV (SEQ ID NO:147), and hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148)) y 56 regiones variables maduras de cadena ligera humanizada ejemplificada (hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), y hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144)).

[00352] Las Figuras 2 y 3 muestran alineaciones de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, de 3D6 murino y varios anticuerpos humanizados. Las Figuras 9A y 9B muestran la alineación de la región variable de la cadena pesada del 3D6 murino con la región variable de la cadena pesada de varios anticuerpos humanizados. Las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D muestran la alineación de la región variable de la cadena ligera de hu3D6VLv2 con la región variable de la cadena ligera de varios anticuerpos humanizados.

[00353] Por razones tales como posible influencia en la conformación de CDR y/o unión al antígeno, mediando la interacción entre cadenas pesadas y ligeras, interacción con la región constante, siendo un sitio para modificación postraducciona deseada o no deseada, siendo un residuo inusual para su posición en una secuencia de región variable humana y, por lo tanto, potencialmente inmunogénica, con potencial de agregación, y otras razones, las siguientes 35 posiciones de marco de región variable se consideraron candidatas para sustituciones en las 56 regiones variables de cadena ligera madura humana ejemplificadas y la variable de cadena pesada madura humana 10 ejemplificada regiones, como se especifica en los ejemplos: L7 (T7S), L10 (T10S), L15 (I15L), L17 (Q17E), L37 (L37Q), L45 (K45R), L47 (L47G, L47N, L47D, L47E, L47P, L47T, L47S, or L47A) , L48 (I48G or I48D), L49 (Y49E), L83 (L83V), L86 (H86Y), L100 (A100Q), L106 (L106I), H1 (Q1E), H5 (Q5V), H11 (L11V), H17 (S17T), H20 (L20I), H23 (T23K), H38 (K38R), H42 (E42G), H43 (Q43K), H66 (K66R), H67 (A67V), H75 (S75T), H76 (N76D), H80 (L80M), H81 (Q81E), H82c (L82cV), H83 (T83R), H91 (Y91F), H93 (A93S), H94 (S94T), H108 (T108L) y H109 (L109V). Las siguientes 9 posiciones de CDR de región variable se consideraron candidatas para sustituciones en las 56 regiones variables de cadena ligera madura humana ejemplificadas y 10 regiones variables de cadena pesada madura humana ejemplificadas, como se especifica adicionalmente en los ejemplos: L24 (K24R), L50 (L50E, L50D, L50G, or L50V), L52 (S52G), L54 (L54D, L54G, L54N, L54E, L54Q, L54K, L54R, L54T, L54V, or L54S), H28 (N28T), H54 (N54D), H56 (D56E), H58 (V58I), and H60 (D60E). 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-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 149. 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

5 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, Kabat CDR-L1 tiene una secuencia de

10 aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, Kabat CDR-L2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 150-175.

[00354] Aquí, como en otros lugares, el residuo mencionado en primer lugar es el residuo de un anticuerpo humanizado formado por injerto de CDR de Kabat o una CDR

15 compuesta de Chothia-Kabat en el caso de CDR-H1 en un marco aceptor humano, y el residuo mencionado en segundo lugar es un residuo que se está considerando para reemplazar dicho residuo. Por tanto, dentro de los marcos de las regiones variables, el primer residuo mencionado es humano, y dentro de las CDR, el primer residuo mencionado es el ratón.

20 **[00355]** 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. 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

25 NO: 80), hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO: 90), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO: 91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146),

30

hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147), and hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148) with any of the humanized 3D6VL light chain variable regions hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83), hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q

(SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), y hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144).

[00356] Los anticuerpos ejemplificados incluyen cualesquiera permutaciones o combinaciones de las regiones variables de cadena pesada maduras ejemplificadas

5 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), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147), y hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID

10 NO:148) 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),

15 hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103),

20 hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID

25 NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124),

30 hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128),

hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), y hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144) con cualquiera de las regiones variables de cadena pesada de 3D6 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).

20 **[00357]** La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada hu3D6VHv1bA11, también conocida como h3D6Hu5, (SEQ ID NO:18) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO:122). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada hu3D6VHv1bA11, también conocida como h3D6Hu5, (SEQ ID NO:18) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (L2-DIM5, SEQ ID NO:123). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada h3D6VHvb8 (SEQ ID NO:146) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (L2-DIM4, SEQ ID NO:122). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada hu3D6VHv1bA11, también conocida como h3D6Hu5, (SEQ ID NO:18) se

combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (L2-DIM3, SEQ ID NO:121). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada hu3D6VHv1bA11, también conocida como h3D6Hu5, (SEQ ID NO:18) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 S52G (L2-DIM9, SEQ ID NO:110). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada h3D6VHvb8 (SEQ ID NO:146) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L54G (L2-DIM7, SEQ ID NO:94). La invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de cadena pesada humanizada hu3D6VHv1bA11, también conocida como h3D6Hu5, (SEQ ID NO:18) se combina con la región variable de cadena ligera humanizada hu3D6VLv2 L50G (L2-DIM22, SEQ ID NO:103).

[00358] La invención proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones variables de cadena pesada humanizadas ejemplificadas se combina con una región constante de cadena pesada humana. Se proporciona una región constante de cadena pesada humana ejemplar como SEQ ID NO: 176 (IgG1: alotipo G1m17,1). Por ejemplo, SEQ ID NO: 178 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada madura de una variante humanizada 3D6 (alotipo hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17). Por ejemplo, SEQ ID NO: 180 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de una variante humanizada 3D6 (alotipo hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17) de péptido señal de alfa-lactoalbúmina bovina en el extremo N-terminal. La invención proporciona un anticuerpo en el que cualquiera de las regiones de cadena ligera humanizadas ejemplificadas se combina con una región constante de cadena ligera. Se proporciona una región constante de cadena ligera ejemplar como SEQ ID NO: 177 (kappa). Por ejemplo, SEQ ID NO: 179 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera madura de una variante humanizada 3D6 (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa). Por ejemplo, SEQ ID NO: 181 establece la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de una variante humanizada 3D6 (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa) con péptido señal de alfa-lactoalbúmina bovina en el extremo N-terminal.

[00359] 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), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91), hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8, 5 SEQ ID NO:146), hu3D6VHv1bA11 L82cV (SEQ ID NO:147), o hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9, SEQ ID NO:148) 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), hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO: 85), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54G 10 (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54N (SEQ ID NO:95), hu3D6VLv2 L54E (SEQ ID NO:96), hu3D6VLv2 L50E (SEQ ID NO:97), hu3D6VLv2 L54Q (SEQ ID NO:98), hu3D6VLv2 L50D (SEQ ID NO:99), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 I48G (SEQ ID NO:104), hu3D6VLv2 I48D (SEQ ID NO:105), hu3D6VLv2 15 L47G (SEQ ID NO:106), hu3D6VLv2 Y49E (SEQ ID NO:107), hu3D6VLv2 L54V (SEQ ID NO:108), hu3D6VLv2 L54S (SEQ ID NO:109), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L47N (SEQ ID NO:111), hu3D6VLv2 L47D (SEQ ID NO:112), hu3D6VLv2 L47E (SEQ ID NO:113), hu3D6VLv2 L47P (SEQ ID NO:114), hu3D6VLv2 L47T (SEQ ID NO:115), hu3D6VLv2 L47S (SEQ ID NO:116), hu3D6VLv2 L47A (SEQ ID NO:117), 20 hu3D6VLv2 L50V (SEQ ID NO:118), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), 25 hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (SEQ ID NO:134), hu3D6VLv2 30 L37Q_L50E_L54R (SEQ ID NO:135), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2

L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), o
 5 hu3D6VLv2 G100Q (SEQ ID NO:144). 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o todas las 44 retromutaciones u otras mutaciones en las SEQ ID NO: 76-80, SEQ ID NO: 90- 91, SEQ ID NOs: 146-148, SEQ ID NOs: 83-85 y SEQ ID NOs: 93-145 se retienen.

10 **[00360]** 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 están ocupadas por S y T, respectivamente.

15 **[00361]** En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición H91 en la región VH está ocupada por F.

[00362] 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
 20 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.

25 **[00363]** 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.

30 **[00364]** En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición H58 en la región VH está ocupada por I.

[00365] 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.

- 5 **[00366]** 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 en la región VH están ocupadas por D y E, respectivamente.

- [00367]** En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes
10 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
15 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.

- 20 **[00368]** 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.
25 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 el 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,
30 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

5 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,

10 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.

[00369] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición H60 está ocupada por E, como en hu3D6VHv1bA11 D60E (h3D6VHvb8). En algunos anticuerpos 3D6

15 humanizados, la posición H82C está ocupada por V, como en hu3D6VHv1bA11 L82cV. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones H60, H80, H81, H82c, y H83 están ocupadas por E, M, E, V, y R, como en hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (h3D6VHvb9).

[00370] La región variable de cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos

20 arriba referenciados se puede modificar para reducir aún más la inmunogenicidad. Por ejemplo, en algunos de los anticuerpos humanizados la posición H80 está ocupada por M y/o la posición H82c está ocupada por V.

[00371] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes posiciones en la región VL está ocupada por el aminoácido especificado: L7 está

25 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.

[00372] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, al menos una de las siguientes

30 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.

[00373] 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.

[00374] La región variable de la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente se puede modificar para reducir aún más la inmunogenicidad. Por ejemplo, en algunos de los anticuerpos humanizados, la posición L47 está ocupada por G, N, D, E, P, T, S o A; la posición L48 está ocupada por G o D; la posición L49 está ocupada por E; la posición L50 está ocupada por E, D, G o V; la posición L52 está ocupada por G; y/o la posición L54 está ocupada por D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S. La región variable de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente se puede modificar para reducir adicionalmente la inmunogenicidad. Por ejemplo, en algunos de los anticuerpos humanizados la posición H80 está ocupada por M y/o la posición H82c está ocupada por V.

[00375] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por D, como en hu3D6VLv2 L54D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por G, como en hu3D6VLv2 L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por N, como en hu3D6VLv2 L54N. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por E, como en hu3D6VLv2 L54E. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L50 está ocupada por E, como en hu3D6VLv2 L50E. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por Q, como en hu3D6VLv2 L54Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L50 está ocupada por D, como en hu3D6VLv2 L50D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por K, como en hu3D6VLv2 L54K. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por R, como en hu3D6VLv2 L54R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por T, como en hu3D6VLv2 L54T. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L50 está ocupada por G, como en hu3D6VLv2 L50G. En

algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L48 está ocupada por G, como en hu3D6VLv2 I48G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L48 está ocupada por D, como en hu3D6VLv2 I48D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por G, como en hu3D6VLv2 L47G. En algunos anticuerpos

5 3D6 humanizados, la posición L49 está ocupada por E, como en hu3D6VLv2 Y49E. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por V, como en hu3D6VLv2 L54V. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L54 está ocupada por S, como en hu3D6VLv2 L54S. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L52 está ocupada por G, como en hu3D6VLv2 S52G. En algunos anticuerpos

10 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por N, como en hu3D6VLv2 L47N. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por D, como en hu3D6VLv2 L47D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por E, como en hu3D6VLv2 L47E. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por P, como en hu3D6VLv2 L47P. En algunos anticuerpos

15 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por T, como en hu3D6VLv2 L47T. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por S, como en hu3D6VLv2 L47S. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L47 está ocupada por A, como en hu3D6VLv2 L47A. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L50 está ocupada por V, como en hu3D6VLv2 L50V.

20 **[00376]** En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, G, y R, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, G, y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52,

25 y L54 están ocupadas por Q, G, y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52, y L54 están ocupadas por Q, G, y R, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52, y L54 están ocupadas por Q, G, y T, respectivamente, como en hu3D6VLv2

30 L37Q_S52G_L54T. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52, y L54 están ocupadas por Q, G, y D, respectivamente, como en hu3D6VLv2

L37Q_S52G_L54D.

[00377] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L54 are occupied Q y R, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L54R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y D, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L54D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L50 están ocupadas por Q y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L50 están ocupadas por Q y D, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y T, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L54T. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L52 están ocupadas por Q y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37 y L54 están ocupadas por Q y E, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L54E.

[00378] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, D, y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, D, y R, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, E, y G, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, y L54 están ocupadas por Q, E, y R, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R.

[00379] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, L54, y L100 están ocupadas por Q, G, R, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, L54, y L100 están ocupadas por Q, G, G, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52, L54, y L100 están ocupadas por Q, G, R, y Q, respectivamente,

como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L52, L54, y L100 están ocupadas por Q, G, D, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, L54, y L100 están ocupadas por Q, D, G, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, L54, y L100 están ocupadas por Q, D, R, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, las posiciones L37, L50, L54, y L100 están ocupadas por Q, V, D, y Q, respectivamente, como en hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q.

[00380] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L37 está ocupada por Q, como en hu3D6VLv2 L37Q. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la posición L100 está ocupada por Q como en hu3D6VLv2 G100Q.

[00381] Algunos anticuerpos 3D6 humanizados comprenden una región variable de cadena pesada madura que comprende las CDR H1, H2 y H3 que comprenden las SEQ ID NO: 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, la posición H58 ocupada por V o I, la posición y H60 puede estar ocupada por D o E, una región variable de cadena ligera madura que comprende las CDR L1, L2 y L3 que comprenden las SEQ ID NO: 12, 13, y 14 respectivamente, excepto que la posición L24 puede ser ocupada por K o R, la posición L50 puede ser ocupada por L, E, D, G o V, la posición L52 puede ser ocupada por S o G, y la posición L54 puede estar ocupada por L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, 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, H60 está ocupada por E, H82c está ocupada por V, L10 está ocupada por T, L17 está ocupada por E, L24 está ocupada por R, L37 está ocupada por Q, L47 está ocupada por G, N, D, E, P, T, S, or A, L48 está ocupada por G or D, L49 está ocupada por E, L50 está ocupada por E, D, G, or V, L52 está ocupada por G, L54 está ocupada por D, G, N, E,

Q, K, R, T, V, or S, L83 está ocupada por L, L86 está ocupada por H, L100 está ocupada por Q, L106 está ocupada por L.

[00382] Algunos anticuerpos 3D6 humanizados comprenden tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 3D6, en el que 3D6 es un anticuerpo de ratón caracterizado por una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 11, excepto que la posición H27 puede estar ocupada por F o Y, la posición H28 puede estar ocupada por N o T, la posición H29 puede estar ocupada por I o F, la posición H30 puede estar ocupada por K o T, la posición H51 puede estar ocupada por I o V, la posición H54 puede estar ocupada por N o D, la posición H60 puede estar ocupada por D, A o E, la posición H61 puede estar ocupada por P o E, la posición H102 puede estar ocupada por F o Y, la posición L50 puede estar ocupada por L, E, D, G o V, la posición L52 puede estar ocupada por S o G, y la posición L54 puede estar ocupada por L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, donde al menos una de las siguientes posiciones está ocupada por el aminoácido especificado: L37 está ocupada por Q, L47 está ocupada por G, N, D, E, P, T, S o A, L48 está ocupada por G o D, L49 está ocupada por E, L50 está ocupada por E, D, G, or V, L52 está ocupada por G, L54 está ocupada por D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S, L100 está ocupada por Q, H60 está ocupada por E, H82c está ocupada por V.

[00383] En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la cadena pesada variable tiene >85% de identidad con la secuencia humana. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la cadena ligera variable tiene >85% de identidad con la secuencia humana. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, cada cadena pesada variable y cadena ligera variable tiene >85% de identidad con la secuencia de la línea germinal humana. En algunos 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 está ocupada por V o I, la posición H60 está ocupada por D o E, la posición L24 está ocupada por K o R, la posición L50 está ocupada por L, E, D, G o V, la posición L52 está ocupada por S o G, y la posición

L54 está ocupada por L, D, G, N, E, Q, K, R, T, V o S. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la CDR-H1 del Compuesto de Kabat/Chothia tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 86. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la CDR-H2 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende
5 SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 149. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la CDR-L1 de Kabat tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 89. En algunos anticuerpos 3D6 humanizados, la CDR-L2 de Kabat comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 150-175.

10 **[00384]** 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.

15 **[00385]** 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.

20 **[00386]** 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
25 potenciales de contacto 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
30 utilizan diferentes secuencias de 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.

[00387] Preferiblemente, las sustituciones o las mutaciones en las variantes 3D6 humanizadas (sean o no conservadoras) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o potencia de unión del mAb humanizado, es decir, su capacidad para unirse a tau.

[00388] Los anticuerpos 3D6 humanizados se caracterizan además por su capacidad para unirse a formas tau fosforiladas y no fosforiladas y mal plegadas/agregadas

10 **D. Anticuerpos quiméricos y revestidos**

[00389] La invención proporciona además formas quiméricas y revestidas de anticuerpos no humanos, particularmente los anticuerpos 3D6 de los ejemplos.

[00390] Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un ratón) se combinan con regiones constantes de cadenas ligeras y pesadas humanas. Dichos anticuerpos retienen sustancial o totalmente la especificidad de unión del anticuerpo de ratón y son aproximadamente dos tercios de la secuencia humana. En una modalidad, un anticuerpo 3D6 quimérico tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 72 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 73.

[00391] Un anticuerpo recubierto es un tipo de anticuerpo humanizado que retiene algunas y generalmente todas las CDR y algunos de los residuos del marco de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros residuos del marco de la región variable que pueden contribuir a epítopos celulares B o T, por ejemplo, residuos expuestos (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDR son total o sustancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de la región variable del anticuerpo no humano se vuelven más similares a los humanos mediante las sustituciones. Las formas recubiertas del anticuerpo 3D6 se incluyen en la invención.

E. Anticuerpos humanos

[00392] Los anticuerpos humanos contra tau o un fragmento de la misma (por ejemplo, residuos de aminoácidos 199-213 y/o 262-276 de SEQ ID NO: 3, correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 y/o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1 o los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1 o cualquier combinación de 2, 3 o los 4 de los mismos) se proporcionan mediante una variedad de técnicas descritas a continuación. Algunos anticuerpos humanos se seleccionan mediante experimentos de unión competitiva, mediante el método de presentación en fagos de Winter, anteriormente, o de otro modo, para que tengan la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo de ratón particular, tal como uno de los anticuerpos monoclonales de ratón descritos en los ejemplos. Los anticuerpos humanos también se pueden cribar para una especificidad del epítipo usando solo un fragmento de tau, tal como un fragmento de tau que contiene solo los residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1) o que contiene solo los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, como antígeno objetivo, y/o mediante el cribado de anticuerpos contra una colección de variantes de tau, tales como variantes de tau que contienen diversas mutaciones dentro de los residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1), o dentro de los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1.

[00393] Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método de trioma de Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, Patente Estadounidense No. 4,634,664; y Engleman et al., Patente Estadounidense 4,634,666, el uso de ratones transgénicos que incluyen genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397; US 5,874,299; US 5,814,318; US 5,789,650; US 5,770,429; US 5,661,016; US 5,633,425; US 5,625,126; US 5,569,825; US 5,545,806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); y Kucherlapati,

WO 91/10741 (1991)) métodos de despliegue de fagos (ver, por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/01047; US 5,877,218; US 5,871,907; US 5,858,657; US 5,837,242; US 5,733,743; y US 5,565,332); y los métodos descritos en WO 2008/081008 (por ejemplo, inmortalizar células B de memoria aisladas de seres humanos, por ejemplo, con EBV, cribado de propiedades deseadas y clonación y expresión de formas recombinantes).

F. Selección de la Región Constante

[00394] 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).

[00395] 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
- 5 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
- 10 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.
- 15 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.
- 20 **[00396]** 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.
- 25 **[00397]** 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
- 30 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. Una región constante de cadena pesada ejemplar es SEQ ID NO: 176, con o sin la lisina de la C-terminal, y una región constante de cadena ligera ejemplar es SEQ ID NO: 177.

5 **G. Expresión de anticuerpos recombinantes**

10 **[00398]** 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
15 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
20 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.

25 **[00399]** 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
30 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).

35 **[00400]** 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_γI para la cadena pesada y pCMV-McI Para la cadena ligera. Estos vectores codifican regiones constantes de γ 1 y Ck 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.

10 **[00401]** 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.

15 **[00402]** 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.

25 **[00403]** *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

30

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.

[00404] 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).

[00405] 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.

[00406] 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 o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), y los núcleos de dichas células se transfieren a ovocitos enucleados.

[00407] 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.

[00408] 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)).

[00409] 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).

IV. Inmunógenos Activos

[00410] Un agente utilizado para la inmunización activa sirve para inducir en un paciente los mismos tipos de anticuerpos descritos en relación con la inmunización pasiva anteriormente. Los agentes utilizados para la inmunización activa pueden ser los mismos tipos de inmunógenos utilizados para generar anticuerpos monoclonales en animales de laboratorio, por ejemplo, un péptido de 3-15 o 3-12 o 5-12, o 5-8 aminoácidos contiguos de una región de tau correspondiente a los residuos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1), tal como, por ejemplo, un péptido que incluye los residuos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1) o de una región de tau correspondiente a los residuos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1, como por ejemplo, un péptido que incluye los residuos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1. Para inducir la unión de anticuerpos al mismo epítipo o superpuesto que 3D6, se puede mapear la especificidad del epítipo de estos anticuerpos (por ejemplo, probando la unión a una serie de péptidos superpuestos que abarcan tau). A continuación, se puede utilizar como inmunógeno un fragmento de tau que consiste en, incluye o se superpone al epítipo. Estos fragmentos se utilizan típicamente en forma no fosforilada.

[00411] El vehículo heterólogo y el adyuvante, si se usan, pueden ser los mismos que se usan para generar el anticuerpo monoclonal, pero también se pueden seleccionar para una mejor idoneidad farmacéutica para su uso en seres humanos. Los vehículos adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas, como difteria (por ejemplo, CRM 197), *E. coli*, cólera o *H. pylori*, o un derivado de toxina atenuada. Los epítipos de células T también son moléculas portadoras adecuadas. Algunos conjugados se pueden formar uniendo agentes de la invención a una molécula de polímero inmunoestimulador (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un polímero de manosa) o glucano (polímero α 1 $\rightarrow$ 2)), citocinas (por ejemplo, péptidos IL-1, IL-1 α y β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1- α y β , y RANTES). Los inmunógenos pueden unirse a los vehículos con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly). Los vehículos

adicionales incluyen partículas similares a virus. Las partículas similares a virus (VLP), también llamadas pseudoviriones o partículas derivadas de virus, representan estructuras de subunidades compuestas por múltiples copias de una cápside viral y/o una proteína de la envoltura capaz de autoensamblarse en VLP de simetría esférica definida *in vivo*. (Powilleit, et al., (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) Alternativamente, los inmunógenos peptídicos se pueden unir a al menos un epítipo de células T artificial capaz de unirse a una gran proporción de moléculas de MHC de clase II, como el epítipo pan DR ("PADRE"). PADRE se describe en US 5,736,142, WO 95/07707 y Alexander J et al, *Immunity*, 1:751-761 (1994). Los inmunógenos activos se pueden presentar en forma multimérica en la que se presentan múltiples copias de un inmunógeno y/o su portador como una única molécula covalente.

[00412] Los fragmentos se administran a menudo con adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El adyuvante aumenta el título de anticuerpos inducidos y/o la afinidad de unión de los anticuerpos inducidos en relación con la situación si el péptido se usara solo. Puede usarse una variedad de adyuvantes en combinación con un fragmento inmunogénico de tau para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin causar cambios conformacionales en el inmunógeno que afectan la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, monofosforil lípido A 3 De-O-acilado (MPL™) (ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora parte de Corixa). Stimulon™ QS-21 es un glucósido triterpénico o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en América del Sur (ver Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; ahora Antigenics, Inc., Nueva York, NY). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tales como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como monofosforil lípido A (ver Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos y micobacterias muertas. Los adyuvantes Ribi son emulsiones de aceite en agua. Ribi contiene un aceite metabolizable (escualeno) emulsionado con solución salina que contiene Tween 80. Ribi también contiene

productos micobacterianos refinados que actúan como inmunoestimulantes y monofosforil lípido A bacteriano. Otro adyuvante es CpG (WO 98/40100). Los adyuvantes se pueden administrar como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o se pueden administrar por separado, antes, al mismo tiempo o después de la administración del agente terapéutico.

[00413] También pueden usarse análogos de fragmentos naturales de tau que inducen anticuerpos contra tau. Por ejemplo, uno o más o todos los L-aminoácidos pueden sustituirse con D aminoácidos en tales péptidos. También se puede invertir el orden de los aminoácidos (retro péptido). Opcionalmente, un péptido incluye todos los D-aminoácidos en orden inverso (péptido retro-inverso). Los péptidos y otros compuestos que no tienen necesariamente una similitud significativa en la secuencia de aminoácidos con los péptidos tau pero que, no obstante, sirven como miméticos de los péptidos tau e inducen una respuesta inmune similar. También se pueden usar anticuerpos antiidiotípicos contra anticuerpos monoclonales para tau como se describió anteriormente. Dichos anticuerpos anti-Id imitan el antígeno y generan una respuesta inmune al mismo (ver *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., P. 181).

[00414] Los péptidos (y opcionalmente un portador fusionado al péptido) también pueden administrarse en forma de un ácido nucleico que codifica el péptido y expresarse *in situ* en un paciente. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno está típicamente unido a elementos reguladores, como un promotor y un potenciador que permiten la expresión del segmento de ADN en las células objetivo previstas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, los elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada o el promotor y potenciador temprano intermedio principal de CMV son adecuados para la expresión directa. Los elementos reguladores enlazados y las secuencias codificantes a menudo se clonan en un vector. Los anticuerpos también se pueden administrar 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 se unen preferiblemente como un anticuerpo de cadena única. También se pueden preparar anticuerpos para

administración pasiva, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad a partir de sueros de pacientes tratados con inmunógenos peptídicos.

[00415] El ADN se puede entregar en forma desnuda (es decir, sin materiales coloidales o encapsulantes). Alternativamente, se pueden usar varios sistemas de
 5 vectores virales, incluidos los sistemas retrovirales (ver, por ejemplo, Lawrie y Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)), vectores adenovirales (véase, por ejemplo, Bett et al, *J. Virol.* 67, 591 1 (1993)) incluyendo vectores derivados de retrovirus tales como MMLV, VIH-1 y ALV; vectores de virus adenoasociados (véase, por ejemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vectores lentivirales tals como los basados
 10 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
 15 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)).

[00416] 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
 20 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).

[00417] 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
 30 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).

5 **[00418]** 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
10 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.

H. Ensayos de selección de anticuerpos

15 **[00419]** 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.

20 **[00420]** 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
25 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
30 a desactivar la expresión del gen y la eficacia de los anticuerpos. en la inhibición de la formación de agregados tau o desagregándolos.

[00421] Los anticuerpos o inmunógenos activos 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.

[00422] 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.

[00423] La actividad de los anticuerpos o agentes activos 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
5 inmunógenos activos también pueden ser probados para la inducción de anticuerpos en el suero. Los inmunógenos tanto pasivos como activos 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
10 síntomas de enfermedades caracterizadas por tau. Las pruebas en un anticuerpo o agente activo 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
15 a prueba pueden evaluarse en relación con el control.

V. Pacientes Susceptibles de Tratamiento

[00424] 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
20 postencefalítico, 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
25 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
30 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.

[00425] 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.

[00426] 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.

10 **I. Ácidos Nucleicos**

[00427] 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, SEQ ID NOS: 146-148, SEQ ID NOS: 83-85, SEQ ID NOS: 93-145 y SEQ ID NOS: 178-181). Un ácido nucleico ejemplar que codifica una cadena pesada de la invención es la SEQ ID NO: 182, y un ácido nucleico ejemplar que codifica una cadena ligera de la invención es SEQ ID NO: 183. Opcionalmente, tales ácidos nucleicos codifican además un péptido señal y pueden expresarse con 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.

J. Anticuerpos Conjugados

5

[00428] 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 posencefalítico, 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 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 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 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 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 enfermedad de Alzheimer (LBVAD), encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

[00429] 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 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.

[00430] 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).

[00431] 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 111In y 90Y, se puede usar o 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).

[00432] 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

5 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).

[00433] Los anticuerpos también se pueden acoplar con otras proteínas. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden acoplar con finómeros. Los finómeros son pequeñas

10 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

15 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

20 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).

[00434] Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden

25 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.

[00435] Los anticuerpos también se pueden acoplar con una etiqueta detectable. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar la enfermedad de

30 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),

5 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 determinaciones en sujetos que tienen o son susceptibles a enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, deterioro cognitivo leve,

10 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

15 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 pueden estar acoplados o unidos a un anticuerpo incluyen diversas enzimas, tales como peroxidasa de rábano

20 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;

25 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 (²⁰¹Ti), 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 ¹¹⁷Tin;

30 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.

[00436] La unión de los radioisótopos a los anticuerpos puede realizarse con quelatos bifuncionales convencionales. Para radioplatina-111 y radioplatina-199, se pueden
 5 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*
 10 *Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1: S91-S95 (2001).

[00437] 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
 15 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* (2ª 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.
 20 475-506 (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
 25 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.

VI. Composiciones farmacéuticas y métodos de uso

[00438] En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o agente para inducir 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 o agente para inducir 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.

[00439] 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 .

[00440] 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.

[00441] 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.

5 **[00442]** La cantidad de un agente para la administración activa varía de 0.1 a 500 µg por paciente y más habitualmente de 1 a 100 o de 1 a 10 µg por inyección para la administración humana. El momento de las inyecciones puede variar significativamente desde una vez al día, una vez al año, hasta una vez por década. Un régimen típico
10 consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de tiempo, como intervalos de 6 semanas o dos meses. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen implica una inyección cada dos meses de por vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden realizarse de forma irregular, como se indica mediante el seguimiento de la respuesta inmunitaria.

15 **[00443]** Los anticuerpos o agentes para inducir 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,
20 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
25 ejemplo, inyección intracraneal.

[00444] 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
30 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
5 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.

[00445] Los regímenes presentes pueden administrarse en combinación con otro
10 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
15 dopamina, inhibidores de la COMT, inhibidores de la MAO-B, amantadina o agentes anticolinérgicos.

[00446] 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
20 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
25 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.

[00447] Las dosis ejemplares para un anticuerpo son 0.1-60 mg/kg (por ejemplo,
30 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.

[00448] La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular.

- 5 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.

[00449] 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.

- 10 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
15 frecuencia de dosificación ejemplar es de diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

[00450] 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
20 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,
25 trimestralmente, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

A. Métodos de Diagnóstico y de Monitoreo

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

- 30 **[00451]** La invención proporciona métodos de obtención de imágenes *in vivo* de depósitos de proteína tau (por ejemplo, ovillos neurofibrilares e inclusiones de tau) en un

paciente. Los métodos funcionan administrando un reactivo, como un anticuerpo que se une a tau (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de ratón, humanizado, quimérico o recubierto), al paciente y luego detectando el agente después de que se haya unido. Anticuerpos que se unen a un epítipo de tau dentro de los residuos de aminoácidos 199-213 o 262-276 de SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 o 320-334, respectivamente, de SEQ ID NO: 1) o dentro de los residuos de aminoácidos 259-268 o 290-299 o 321-330 o 353-362 de SEQ ID NO: 1 se prefieren. En algunos métodos, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los residuos de aminoácidos 199-213 de la SEQ ID NO: 3 (correspondientes a los residuos de aminoácidos 257-271 de la SEQ ID NO: 1), o dentro de los aminoácidos 262-276 de la SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los residuos de aminoácidos 320-334 de SEQ ID NO: 1). En algunos métodos, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los residuos de aminoácidos 259-268 de SEQ ID NO: 1, dentro de los aminoácidos 290-299 de SEQ ID NO: 1, dentro de los aminoácidos 321-330 de SEQ ID NO: 1, o dentro de los aminoácidos 353-362 de SEQ ID NO: 1. Puede evitarse o reducirse una respuesta de depuración a los anticuerpos administrados mediante el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen de una región constante de longitud completa, como los Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como reactivo de tratamiento y diagnóstico.

[00452] 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).

[00453] 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
5 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
10 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.

[00454] 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
15 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
20 valores en relación con la línea de base señala una respuesta positiva al tratamiento.

[00455] 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
25 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.

[00456] 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
30 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.

[00457] 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.

[00458] 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.

[00459] 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.

5 **[00460]** 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, 15 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).

20 **[00461]** 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). 25 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 30 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.

[00462] 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.

[00463] 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.

[00464] 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

5 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

10 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.

[00465] En algunos pacientes, el monitoreo indica una disminución detectable en

15 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.

[00466] Si el monitoreo indica que los niveles de depósitos de proteína tau en un

20 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

25 régimen puede verse afectado por la reducción de la dosis y/o la frecuencia de administración de la inmunoterapia.

[00467] 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

30 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
5 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.

10 **[00468]** 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
15 tratamientos.

[00469] 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
20 ejemplo, un anticuerpo 3D6 de ratón, humanizado, quimérico o revestido) en lugar de las exploraciones de PET para realizar tales métodos

[00470] 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
25 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
30 ejemplo, la vida media de algunos anticuerpos humanos es del orden de 20 días.

- [00471]** 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.
- [00472]** 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).

[00473] 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

[00474] 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.

- 5 **[00475]** 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.

- 10 **[00476]** 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.

15

VIII. Otras Aplicaciones

- 20 **[00477]** 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
- 25 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)
- 30 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.

[00478] 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 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 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). 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 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, 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),
5 encefalopatía traumática crónica (CTE), tauopatía globular (GGT), o parálisis supranuclear progresiva (PSP).

[00479] 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
10 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.

[00480] Todas las solicitudes de patente, sitios web, otras publicaciones, números
15 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.
20 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
25 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
30 alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

[00481] Ejemplo 1. Identificación de Anticuerpos Monoclonales de tau

[00482] 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.

[00483] 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). El 3D6 reaccionó a péptidos correspondientes a los residuos de aminoácidos 199-213 de SEQ ID NO: 3 y a los residuos de aminoácidos 262-276 de SEQ ID NO: 3 (siguiendo la numeración de la isoforma de CNS más larga de tau, esto corresponde a los residuos de aminoácidos 257-271 de SEQ ID NO: 1 y a los residuos de aminoácidos 320-334 de SEQ ID NO: 1).

[00484] Ejemplo 2. Mapeo de epítomos del anticuerpo 3D6

[00485] 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.

[00486] 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. Se detectó unión positiva para los residuos de aminoácidos de expansión peptídica 199-213 (de SEQ ID NO: 3) y los residuos de aminoácidos 262-276 (de SEQ ID NO: 3). Usando la numeración de la proteína tau humana 4R2N de longitud total (441 aminoácidos), estos péptidos corresponden a los residuos de aminoácidos 257-271 (de SEQ ID NO: 1) y 320-334 (de SEQ ID NO: 1) (Figura 1).

[00487] Ejemplo 3. Diseño de anticuerpos 3D6 humanizados

[00488] 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.

[00489] 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.

[00490] 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 secuencias aceptoras 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.

[00491] 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).

[00492] 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

5 ...

- 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.)

10 - 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.),

15 - son susceptibles a modificaciones postraduccionales, como glicosilación o piroglutaminación,

- están ocupadas por residuos que se prevé que choquen con los CDR, según el

20 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.

[00493] Se muestran alineaciones del 3D6 murino y varios anticuerpos

25 humanizados para las regiones variables de cadena ligera (Tabla 4 y Figura 3) y regiones variables de cadena pesada (Tabla 3 y Figura 2).

[00494] Se construyeron 7 variantes de la región variable de cadena pesada humanizada y 3 variantes de la región variable de cadena ligera humanizada que

30 contenían diferentes permutaciones de sustituciones: hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, 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.

[illegible]

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_huFrwk (SEQ ID NO:75)	Hu3D6 VHvb1 (SEQ ID NO:76)	Hu3D6 VHvb2 (SEQ ID NO:77)	Hu3D6 VHvb3 (SEQ ID NO:78)	Hu3D6 VHwb4 (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_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)
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

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_huFwk (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	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]

[00496] 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)	Hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)	Hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)	Hu3D6VLvb3 (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

[00497] 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

[00498] 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_huFwk (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

[00499] 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 huFrwk (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>
<u>L7</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
<u>L10</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>
<u>L15</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>L</u>
<u>L17</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>
<u>L24</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>
<u>L37</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>
<u>L45</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>
<u>L83</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>V</u>
<u>L86</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>H</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>
<u>L100</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>
<u>L106</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>I</u>

- 5 **[00500]** Las posiciones en las que los residuos canónicos, de vernier o de interfaz difieren entre las secuenciasceptoras 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
- 10 Tabla 3. Los ejemplos de residuos de interfaz/empaquetamiento (VH + VL) incluyen residuos H91 y H93 de Kabat en la Tabla 3.

[00501] 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.

[00502] *Regiones variables de cadena pesada*

5 **[00503]** *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) .

[00504] *hu3D6VHvb2*

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

[00505] *hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7*

20 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.

[00506] Q1E: es una mutación potenciadora de la estabilidad para mitigar el potencial de formación de piroglutamato (Liu, supra).

25 **[00507]** 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.

30 **[00508]** 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.

[00509] 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.

5 **[00510]** 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.

[00511] 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.

10 **[00512]** N28T: esta es una sustitución del residuo CDR-H1 por Thr.

[00513] 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.

15 **[00514]** 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.

20 **[00515]** 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.

25 **[00516]** 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.

30 **[00517]** 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.

[00518] 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.

[00519] 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.

[00520] 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.

[00521] 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.

[00522] 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.

[00523] Q81E: se predice que Glu forma un enlace H más un puente salino con K19 por tanto, Glu en esta posición hace mejorar la estabilidad del anticuerpo.

[00524] T83R para mejorar la termoestabilidad y para aumentar 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.

[00525] F91Y: es una mutación de un residuo de interfaz y es una mutación inversa basada en frecuencia. Tyr está típicamente en esta posición y puede mejorar la estabilidad del anticuerpo.

[00526] A93S: es una retro-mutación de una zona de Vernier y un residuo de zona de interfaz.

[00527] S94T: es una retro-mutación de un residuo estructural canónico definido por Chothia y un residuo de vernier.

[00528] 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.

[00529] L109V: es una mutación basada en frecuencia. Val es más frecuente en esta posición.

- 5 **[00530]** 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.

[00531] *Regiones variables de cadena ligera kappa*

[00532] *hu3D6VLvb1*

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

[00533] *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
20 adicionales en Q17E, K24R, L37Q, K45R y L106I

[00534] 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.

- 25 **[00535]** 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.

[00536] 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.

[00537] 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.

5 **[00538]** 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.

10 **[00539]** 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.

15 **[00540]** 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.

20 **[00541]** 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.

25 **[00542]** H86Y: 3D6 VL Murino tiene Tyr en esta posición. Tyr también es el residuo más frecuente en esta posición.

30 **[00543]** 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.

[00544] 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.

[00545] Los diseños basados en estos marcos humanos fueron:

5 Regiones variables de cadena pesada

>hu3D6VHvb1 (SEQ ID NO:76)

QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

>hu3D6VHvb2 (SEQ ID NO:77)

10 EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGRATITADTSTDYALELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

>hu3D6VHvb3 (SEQ ID NO:78)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTIYDPKFQGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

15 hu3D6VHvb4 (SEQ ID NO:79)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTIYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

>hu3D6VHvb5 (SEQ ID NO:80)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
20 ETIYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

>hu3D6VHvb6 (SEQ ID NO:90)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
ETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

>hu3D6VHvb7 (SEQ ID NO:91)

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
ETVYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

Regiones variables de cadena ligera kappa

hu3D6VLvb1 (SEQ ID NO:83)

DVVMQTPTLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSK

30 LD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGT HFPYTFGAGTKLELKR

>hu3D6VLvb2 (SEQ ID NO:84)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLV
 KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIK

>hu3D6VLvb3 (SEQ ID NO:85)

DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV
 5 KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

[00546] 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).

10 **[00547] Ejemplo 4.** Anticuerpos monoclonales de ratón se unen a tau en ensayos ELISA

[00548] Métodos: ELISA indirecto: se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con anticuerpos de captura anti-6xHis (Figura 4A) o anti-tau policlonal (Dako # A0024, Figura 4B) 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 5A) o sin (Figura 4B) 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.

20 **[00549]** 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 A₄₅₀ con un lector de placas. Ver la Figura 4C.

[00550] 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 4A). También se confirmó la unión a la proteína nativa sin etiquetar (Figura 4B). 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 4C).

[00551] Ejemplo 5. Afinidad de anticuerpos monoclonales de ratón a tau

[00552] 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 µl/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.

[00553] 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 5.

[00554] Ejemplo 6. Los anticuerpos monoclonales de ratón evitan la unión de tau humana a la superficie de células neuronales inmortalizadas

[00555] 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 células/pocillo. Cubrir la placa y permitir que las células se unan a 37 ° C, 5% de CO₂,
5 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 la placa a temperatura ambiente durante 1 hora sin agitar.
- 10 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.
 - b. Diluya Tau a 20 nM en PBS. La concentración de Tau será constante en cada
15 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 ambiente con agitación (600 rpm).
- 20 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 150 μ L 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.

[00556] Los anticuerpos probados fueron anticuerpos anti-tau 3D6, 16G7, 3H9, 4C5 y 5G8, y control de isotipo.

[00557] Resultados:

[00558] 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 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 6.

[00559] **Ejemplo 7.** Actividad de desagregación

[00560] 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 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.

[00561] Resultados: Como se muestra en la Figura 7, 3D6 desmonta preferentemente las 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 16G7, un anticuerpo anti-tau que se une a una región diferente de tau.

[00562] Ejemplo 8. Tau de inmunocaptura de 3D6 y 5G8 de tejido de enfermedad humana.

[00563] 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).

[00564] Resultados: como se muestra en la Figura 8, 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.

[00565] Ejemplo 9. Inmunorreactividad inmunohistoquímica de 3D6,

[00566] 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 crio secciones 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.

[00567] 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.

[00568] 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.

[00569] **Ejemplo 10.** Afinidad de variantes humanizadas hacia tau.

[00570] 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.

[00571] 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 A_{450} con un lector de placas.

[00572] El análisis de SPR se realiza usando un Biacore T200 para determinar la cinética de unión de h3D6-VHv5-L2 a tau humana recombinante. Para preparar una superficie de sensor, el anticuerpo anti-humano (GE Life Sciences) se inmoviliza en el chip sensor CM5 mediante acoplamiento de amina, y el anticuerpo variante humanizado se captura a un nivel para asegurar la unión máxima de 50 RU. Varias concentraciones de tau recombinante que oscilan entre 10 y 0.14 nM se pasan 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), para una asociación de 180 y 900 disociación. Los datos tienen doble referencia tanto a un sensor irrelevante que no contiene ligando de anticuerpo como a una concentración de analito 0 nM para explicar la disociación del ligando del resto de captura. Luego, los datos se analizan utilizando un ajuste global 1:1.

[00573] Ejemplo 11 Inmunogenicidad de región variable de cadena ligera de hu3D6VLv2

[00574] Las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21) de se analizaron utilizando la herramienta de desinmunización iedb.org (Dhanda et al, *Immunology*. 2018 Enero; 153 (1): 118-132). La Tabla 9 muestra los péptidos que pueden seleccionarse para la desinmunización de hu3D6VLv2, es decir, sugiriendo áreas en las que podrían realizarse más sustituciones para reducir la inmunogenicidad potencial.

[00575] Tabla 9. Resultados del análisis de inmunogenicidad que identifica péptidos potenciales

Posición de inicio (lineal)	Posición de parada (lineal)	Rango percentil medio	Péptido
1	15	14.845	DVVMTQSPLSLPVTL
51	65	15.745	RLIYLVSKLDSGVDP
46	60	18.58	GQSPRRLIYLVSKLD

[00576] Con base en los resultados del análisis que se muestran en la Tabla

9, se diseñaron variantes de regiones variables de cadena ligera de hu3D6VLv2, dirigidas a los residuos de aminoácidos en negrita en la Tabla 10. Cada variante incorpora una de las siguientes sustituciones de aminoácidos, como se muestra en la Tabla 11.

5 **[00577] Tabla 10. Residuos de aminoácidos en hu3D6VLv2 dirigidos a la sustitución.**

Residuos dirigidos de la región variable de cadena ligera de hu3D6VLv2	SEQ ID NO Original
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLL DSDGKTYLNWLLQRPGQSPRR LIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGFTHFPYTFGGGTKLEIK	21

[00578] Tabla 11. Sustituciones de aminoácidos en hu3D6VLv2 diseñadas para reducir la inmunogenicidad

Número Lineal	Número de Kabat	Nombre de Variante	SEQ ID NO de región variable de cadena ligera resultante
L59D	L54D	hu3D6VLv2 L54D (también conocido como L2-DIM21)	SEQ ID NO:93
L59G	L54G	hu3D6VLv2 L54G (también conocido como L2-DIM7)	SEQ ID NO:94
L59N	L54N	hu3D6VLv2 L54N	SEQ ID NO:95
L59E	L54E	hu3D6VLv2 L54E	SEQ ID NO:96
L55E	L50E	hu3D6VLv2 L50E	SEQ ID NO:97
L59Q	L54Q	hu3D6VLv2 L54Q	SEQ ID NO:98
L55D	L50D	hu3D6VLv2 L50D	SEQ ID NO:99
L59K	L54K	hu3D6VLv2 L54K	SEQ ID NO:100
L59R	L54R	hu3D6VLv2 L54R	SEQ ID NO:101
L59T	L54T	hu3D6VLv2 L54T	SEQ ID NO:102
L55G	L50G	hu3D6VLv2 L50G (también conocido como L2-DIM22)	SEQ ID NO:103
I53G	I48G	hu3D6VLv2 I48G	SEQ ID NO:104
I53D	I48D	hu3D6VLv2 I48D	SEQ ID NO:105
L52G	L47G	hu3D6VLv2 L47G	SEQ ID NO:106
Y54E	Y49E	hu3D6VLv2 Y49E	SEQ ID NO:107
L59V	L54V	hu3D6VLv2 L54V	SEQ ID NO:108
L59S	L54S	hu3D6VLv2 L54S	SEQ ID NO:109
S57G	S52G	hu3D6VLv2 S52G (también conocido como L2-DIM9)	SEQ ID NO:110
L52N	L47N	hu3D6VLv2 L47N	SEQ ID NO:111
L52D	L47D	hu3D6VLv2 L47D	SEQ ID NO:112
L52E	L47E	hu3D6VLv2 L47E	SEQ ID NO:113
L52P	L47P	hu3D6VLv2 L47P	SEQ ID NO:114
L52T	L47T	hu3D6VLv2 L47T	SEQ ID NO:115
L52S	L47S	hu3D6VLv2 L47S	SEQ ID NO:116
L52A	L47A	hu3D6VLv2 L47A	SEQ ID NO:117
L55V	L50V	hu3D6VLv2 L50V	SEQ ID NO:118

[00579] Se diseñaron variantes adicionales de la región variable de la cadena ligera hu3D6VLv2, como se muestra en la Tabla 12, que incorporan sustituciones en uno o dos de los residuos de aminoácidos resaltados en la Tabla 10. Algunas variantes en la Tabla 12 también incorporan la sustitución L37Q (SEQ ID NO: 119-135 y 145), o tanto la sustitución L37Q como la sustitución G100Q (SEQ ID NO: 136-142).

[00580] Los fundamentos para la selección de las posiciones L37Q y G100Q como se indica en la Tabla 12 y la Tabla 13 en la región variable de cadena ligera como candidatos para la sustitución son los siguientes.

[00581] L37Q es una mutación para aumentar la humanidad de la secuencia. Gln es una mutación de alineación germinal. Gln está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27) en esta posición.

[00582] G100Q es una mutación para aumentar la humanidad de la secuencia. Gln es una mutación de alineación germinal. Gln está en el gen de la línea germinal humana IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27) en esta posición.

[00583] **Tabla 12: Sustituciones de aminoácidos en hu3D6VLv2 diseñadas para reducir la inmunogenicidad**

Sustituciones en Variantes Adicionales en hu3D6VLv2 diseñadas para reducir la inmunogenicidad (Número de mutación(es) de Kabat indicadas)	Nombre de Variante	SEQ ID NO: de región variable de cadena ligera resultante
L37Q_L50G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (también conocido como L2-DIM1)	SEQ ID NO:119
L37Q_L50G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (también conocido como L2-DIM2)	SEQ ID NO:120
L37Q_S52G_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (también conocido como L2-DIM3)	SEQ ID NO:121
L37Q_S52G_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (también conocido como L2-DIM4)	SEQ ID NO:122
L37Q_S52G_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (también conocido como L2-DIM5)	SEQ ID NO:123
L37Q_S52G_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (también conocido como L2-DIM6)	SEQ ID NO:124
L37Q_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L54R	SEQ ID NO:125
L37Q_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L54G	SEQ ID NO:126
L37Q_L54D	hu3D6VLv2 L37Q_L54D (también conocido como L2-DIM12)	SEQ ID NO:127
L37Q_L50G	hu3D6VLv2 L37Q_L50G (también conocido como L2-DIM13)	SEQ ID NO:128
L37Q_L50D	hu3D6VLv2 L37Q_L50D (también conocido como L2-DIM14)	SEQ ID NO:129
L37Q_L54T	hu3D6VLv2 L37Q_L54T	SEQ ID NO:130
L37Q_S52G	hu3D6VLv2 L37Q_S52G	SEQ ID NO:131
L37Q_L54E	hu3D6VLv2 L37Q_L54E	SEQ ID NO:145
L37Q_L50D_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (también conocido como L2-DIM17)	SEQ ID NO:132
L37Q_L50D_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (también conocido como L2-DIM18)	SEQ ID NO:133
L37Q_L50E_L54G	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G (también conocido como L2-DIM19)	SEQ ID NO:134
L37Q_L50E_L54R	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R (también conocido como L2-DIM20)	SEQ ID NO:135
L37Q_L50G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:136
L37Q_L50G_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q	SEQ ID NO:137
L37Q_S52G_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q	SEQ ID NO:138
L37Q_S52G_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q	SEQ ID NO:139
L37Q_L50D_L54G_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q	SEQ ID NO:140
L37Q_L50D_L54R_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q	SEQ ID NO:141
L37Q_L50V_L54D_G100Q	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q	SEQ ID NO:142

[00584] Se diseñaron variantes adicionales de la región variable de la cadena ligera de hu3D6VLv2 para incorporar L37Q (SEQ ID NO: 143) o para incorporar G100Q (SEQ ID NO: 144), como se muestra en la Tabla 13.

5 **[00585]** Tabla 13: Sustituciones de aminoácidos adicionales en hu3D6VLv2

Sustituciones en Variantes Adicionales en hu3D6VLv2 (Número de mutación(es) de Kabat indicadas)	Nombre de Variante	SEQ ID NO: de región variable de cadena ligera resultante
L37Q	hu3D6VLv2 L37Q (también conocido como L2-DIM8)	SEQ ID NO:143
G100Q	hu3D6VLv2 G100Q	SEQ ID NO:144

[00586] Las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D muestran alineaciones de la región variable de cadena ligera de versiones humanizadas del anticuerpo 3D6: hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21), hu3D6VLv2 L37Q (SEQ ID NO:143), hu3D6VLv2 L50G (SEQ ID NO:103), hu3D6VLv2 S52G (SEQ ID NO:110), hu3D6VLv2 L54G (SEQ ID NO:94), hu3D6VLv2 L54D (SEQ ID NO:93), hu3D6VLv2 L54K (SEQ ID NO:100), hu3D6VLv2 L54R (SEQ ID NO:101), hu3D6VLv2 L54T (SEQ ID NO:102), hu3D6VLv2 L37Q_L50G (SEQ ID NO:128), hu3D6VLv2 L37Q_L50D (SEQ ID NO:129), hu3D6VLv2 L37Q_S52G (SEQ ID NO:131), hu3D6VLv2 L37Q_L54G (SEQ ID NO:126), hu3D6VLv2 L37Q_L54R (SEQ ID NO:125), hu3D6VLv2 L37Q_L54T (SEQ ID NO:130), hu3D6VLv2 L37Q_L54D (SEQ ID NO:127), hu3D6VLv2 L37Q_L54E (SEQ ID NO:145), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R (SEQ ID NO:119), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G (SEQ ID NO:120), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R (SEQ ID NO:133), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G (SEQ ID NO:132), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D (SEQ ID NO:124), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G (SEQ ID NO:121), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T (SEQ ID NO:123), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R (SEQ ID NO:122), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q (SEQ ID NO:140), hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q (SEQ ID NO:141), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:136), hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q (SEQ ID NO:137), hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q (SEQ ID NO:142), hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q (SEQ ID NO:139), y hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q (SEQ ID NO:138)

[00587] Ejemplo 12 Inmunogenicidad de hu3D6VHv1bA11 (región variable de cadena pesada)

[00588] Se diseñaron variantes adicionales de la región variable de cadena pesada de hu3D6VHv1bA11 (también conocido como h3D6Hu5) (SEQ ID NO: 18), como se muestra en la Tabla 14.

[00589] Las Figuras 9A y 9B muestran alineaciones de la región variable de cadena pesada de 3D6 murino (SEQ ID NO: 7) y de versiones humanizadas del anticuerpo 3D6 (hu3D6VHvb1, hu3D6VHvb2, hu3D6VHvb3, hu3D6VHvb4, hu3D6VHvb5, hu3D6VHvb6, hu3D6VHvb7, hu3D6VHv1bA11, h3D6VHvb8 y h3D6VHvb9) con la secuencia de la región variable de cadena pesada de la línea germinal humana IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25) y con la secuencia de la región variable de cadena pesada del aceptor humano 2RCS VH hFrwk (SEQ ID NO: 75). hu3D6VHvb1 es SEQ ID NO:76, hu3D6VHvb2 es SEQ ID NO:77, hu3D6VHvb3 es SEQ ID NO:78, hu3D6VHvb4 es SEQ ID NO:79, hu3D6VHvb5 es SEQ ID NO:80, hu3D6VHvb6 es SEQ ID NO:90, hu3D6VHvb7 es SEQ ID NO:91, hu3D6VHv1bA11 es SEQ ID NO:18, h3D6VHvb8 es SEQ ID NO:146, y h3D6VHvb9 es SEQ ID NO:148.

[00590] Tabla 14: Sustituciones adicionales de aminoácidos en hu3D6VHv1bA11 (también conocido como h3D6Hu5)

Sustituciones en Variantes Adicionales en hu3D6VHv1bA11 (Número de mutación(es) de Kabat indicadas)	Nombre de Variante	SEQ ID NO de región variable de cadena pesada resultante
D60E	hu3D6VHv1bA11 D60E (también conocido como h3D6VHvb8)	SEQ ID NO:146
L82cV	hu3D6VHv1bA11 L82cV	SEQ ID NO:147
D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R	hu3D6VHv1bA11 D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R (también conocido como h3D6VHvb9)	SEQ ID NO:148

[00591] Los fundamentos para la selección de las posiciones indicadas en la Tabla 14 en la región variable de cadena pesada como candidatos para la sustitución son los siguientes.

[00592] D60E: para reducir la proteólisis potencial. Se sabe que los motivos Asp-Pro son sitios potenciales de escisión proteolítica. Hay un motivo Asp-Pro en hu3D6VHv1bA11 (h3D6Hu5) VH en la posición Kabat 60-61. Basado en el modelo de homología, la sustitución de Glu en la posición 60 se considera conservante de

la conformación. Por lo tanto, la sustitución de D60E se realiza para reducir la proteólisis potencial.

[00593] Q81E, para mejorar termoestabilidad y para aumentar la humanidad. Se predice que Glu forma un enlace H más un puente salino con K19, por lo tanto, Glu en esta posición mejora la estabilidad del anticuerpo. Glu es una mutación de alineación de la línea germinal. Glu está en el gen de la línea germinal humana IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25) en esta posición.

[00594] L82cV para reducir la inmunogenicidad. El análisis *in silico* de la inmunogenicidad humanizada de hu3D6VHv1bA11 (h3D6Hu5) utilizando la herramienta de análisis de inmunogenicidad IEDB (base de datos de epítomos inmunitarios) predijo un péptido inmunogénico potencial que incluía L82c. La sustitución de L82cV está diseñada para reducir la inmunogenicidad. La sustitución de valina en esta posición conserva la conformación del bucle.

[00595] L80M, para reducir la inmunogenicidad; y aumentar la humanidad. Met es una mutación de alineación de la línea germinal. Met está en el gen de la línea germinal humana IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25) en esta posición.

[00596] T83R para mejorar la termoestabilidad y aumentar la humanidad. Arg es una mutación de alineación de la línea germinal. Arg está en el gen de la línea germinal humana IMGT # IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25) en esta posición. Arg es más frecuente en esta posición.

[00597] **Ejemplo 13** Análisis de variantes humanizadas de 3D6

[00598] Las variantes de 3D6 humanizadas con sustituciones desinmunizantes predichas se analizaron para varias características, incluida la afinidad de unión al objetivo, la actividad en ensayos basados en células, la termoestabilidad, las características de expresión y el número de sustituciones. En todos los casos, los resultados se compararon con la secuencia parental, hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 para determinar si se observó alguna pérdida de actividad o estabilidad.

[00599] El análisis de unión al objetivo se realizó usando un Biacore T200 para comparar la afinidad de unión de las variantes de 3D6 humanizadas con la tau 4R0N humana recombinante. El anticuerpo anti-Fc humano se inmovilizó en

el chip sensor CM3 mediante acoplamiento de amina, y las variantes de 3D6 humanizadas se capturaron a niveles equivalentes. Se pasaron varias concentraciones de tau humana 4R0N recombinante (que van de 0.02 nM a 12.5 nM) sobre el ligando capturado a 50 μ L/min en tampón de ejecución (HBS + 0.05% P-20, 1 mg/ml de BSA) durante 180 segundos de asociación/420 segundos de disociación como un solo ciclo. Los datos se restaron en blanco tanto a un sensor irrelevante que no contenía anticuerpo y a una concentración de analito de 0 nM. El análisis se realizó utilizando un ajuste global de 1:1 con el software de evaluación Biacore.

[00600] La determinación de la afinidad reveló una serie de variantes desinmunizadas que conservaban la afinidad de hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2 parental, que se determinó mediante la comparación de la K_D de cada anticuerpo con la de hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 parental. Se determinó que los anticuerpos tienen K_D comparable dentro de 4 veces de hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 (Tabla 15) incluye hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3, h3D6VHvb8/L2-DIM4, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7, h3D6VHvb8/L2-DIM7, h3D6VHvb8/L2-DIM8, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12, hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21, y hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 demostró una afinidad mejorada, como lo demuestran los números de frecuencia activada, baja frecuencia y K_d , sobre el hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 parental.

[00601] Tabla 15. Afinidad de variantes humanizadas de 3D6

Variante de 3D6 Humanizado	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	4.17E+06	7.40E-04	1.81E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	5.65E+06	5.35E-04	9.48E-11
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	4.63E+06	7.40E-04	1.60E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	4.02E+06	7.35E-04	1.83E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	3.93E+06	7.81E-04	1.99E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM4	4.51E+06	1.02E-03	2.26E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM7	4.31E+06	1.19E-03	2.75E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	3.46E+06	9.71E-04	2.81E-10
h3D6VHvb8/L2-DIM8	3.28E+06	1.40E-03	4.27E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	2.74E+06	1.33E-03	4.85E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	2.15E+06	1.49E-03	6.96E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	3.54E+06	2.51E-03	7.08E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM1	3.02E+06	2.60E-03	8.59E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM13	3.15E+06	2.85E-03	9.04E-10
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-17	5.24E+10	5.42E+01	1.03E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM1	6.19E+06	6.41E-03	1.04E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM2	1.03E+10	1.46E+01	1.42E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM6	3.08E+06	4.61E-03	1.49E-09
h3D6VHvb8/L2-DIM6	3.79E+09	5.67E+00	1.50E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM14	7.69E+10	1.18E+02	1.53E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM2	5.73E+06	9.33E-03	1.63E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM19	3.28E+09	5.88E+00	1.79E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM-18	1.51E+06	3.78E-03	2.51E-09
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM20	2.60E+05	9.35E-03	3.60E-08

[00602] Además, como característica secundaria, se analizaron la termoestabilidad y el título para todas las variantes desinmunizadas. Se compararon la termoestabilidad y los niveles de títulos de anticuerpos que eran comparables a hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 con base en medidas de afinidad, y los anticuerpos en la Tabla 16 se enumeran en orden basado en la varianza de T_m de hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2.

[00603] 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 celda de referencia. Se llevaron a cabo velocidades de barrido calorimétrico a velocidades de barrido de 60°C/hora, de 25°C a 110°C a 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.

[00604] El título se determinó como sigue. Después de la expresión en 293 células 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. hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 demostró mayor termoestabilidad y título sobre el hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 parental. Tanto la termoestabilidad como los niveles de expresión transitoria (título) son consideraciones importantes para el desarrollo de fármacos.

[00605] Tabla 16. Termoestabilidad y título de Variantes de 3D6 Humanizado

Variante de 3D6 Humanizado	T _m (°C)—varianza de hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	título (mg/L)
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	0.00	456.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	0.08	467.00
h3D6VHvb8/L2-DIM8	-0.38	301.00
h3D6VHvb8/L2-DIM4	-0.78	445.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22	-1.23	570.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9	-2.19	290.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5	-3.34	383.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM7	-4.24	231.00
h3D6VHvb8/L2-DIM7	-4.83	271.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3	-5.01	283.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM21	-5.17	81.00
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM12	-5.47	94.00

[00606] Con base en el análisis de los hallazgos arriba listados, la actividad de neutralización de siete anticuerpos en la Tabla 16 se seleccionó para mayor análisis en un modelo basado en células de internalización de tau. Se señalan las sustituciones en las cadenas pesada y ligera relativas a hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 parental.

[00607] 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 bloquearán la transmisión de tau.

[00608] Se generaron agregados de tau solubles mediante incubación de tau recombinante de longitud completa con cantidades equimolares de heparina de bajo peso molecular durante 3d a 37°C. Después de la incubación, la tau insoluble y soluble se separó mediante centrifugación a 10,000xg durante 15 minutos. A continuación, se resolvió el sobrenadante mediante cromatografía de exclusión

por tamaño preparativa y se recogieron y concentraron los picos agregados (mayores de 100 kDa). Para medir la internalización, la fracción de agregado soluble se marcó con éster de succinimidilo rojo pHrodo, que emite fluorescencia cuando se internaliza en la vía endolisosómica.

5 **[00609]** Se preincubó oligómero soluble 4R0N de tau humano P301L marcado con pHrodo (concentración final de 1.5 µg/ml) con anticuerpos anti-tau (titulación de la dosis: concentración inicial de 80 µg/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
10 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 CO₂). 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
15 de tampón FACS y se midió la intensidad de fluorescencia media de rojo Texas mediante FACS LSR II. La fluorescencia de rojo Texas de pH rodo se activa por un pH bajo asociado con compartimentos endolisosomales tras la internalización. Debido a que FACS detecta células y Ph rodo solo emite fluorescencia tras la internalización, solo se detectará la tau internalizada por las células. Cuanto
20 menor sea la intensidad de fluorescencia media, menor será la cantidad de tau internalizada, lo que sugiere una mayor actividad de bloqueo del anticuerpo analizado.

[00610] Con la excepción de hu3D6VHv1bA11 L2-DIM22, todas las variantes probadas mostraron un alto grado de actividad inhibitoria en el modelo de
25 internalización de tau a una concentración equivalente (Figura 11 y Tabla 17).

[00611] **Tabla 17. Variantes de 3D6 humanizadas probadas en un ensayo de internalización de Tau basado en células**

Variante de 3D6 Humanizado	Sustituciones de Cadena Pesada Relativas a hu3D6VHv1bA11 Parental	Sustituciones de Cadena Ligera Relativas a hu3D6VLv2 Parental	Inhibición de internalización basada en células (a concentración de anticuerpos de 133 nM, % de inhibición de señal de fluorescencia máxima $\pm$ desviación estándar)
hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2			87.2 $\pm$ 1.6
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4		L37Q_S52G_L54R	92.2 $\pm$ 2.4
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM5		L37Q_S52G_L54T	92.7 $\pm$ 3.6
h3D6VHvb8/L2-DIM4	D60E	L37Q_S52G_L54R	89.4 $\pm$ 2.6
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM3		L37Q_S52G_L54G	87.4 $\pm$ 3.6
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM9		S52G	96 $\pm$ 3.5
h3D6VHvb8/L2-DIM7	D60E	L54G	93.2 $\pm$ 1.3
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM22		L50G	8.7 $\pm$ 8.6

[00612] Ejemplo 14. Refinamiento del mapeo de epítomos de 3D6

[00613] El mapeo inicial de péptidos indicó que el epítopo para 3D6 está en la región de repetición de unión a microtúbulos (MTBR, Figura 1). Además, el mapeo de péptidos indicó que 3D6 se une a múltiples sitios dentro del MTBR, lo que sugiere un epítopo repetido y discontinuo.

[00614] Como el mapa de péptidos inicial utilizado para los estudios de epítomos utilizó solapamientos de péptidos solapantes que no contenían repeticiones de unión de microtúbulos intactas, se llevó a cabo un mapa de péptidos adicional con las repeticiones de microtúbulos intactos individuales. Los péptidos biotinilados correspondientes a los aminoácidos para la repetición 1-4 de MTBR se añadieron a una placa ELISA recubierta con estreptavidina, se lavaron y se bloquearon en BSA al 1%/PBS. A continuación, se incubaron en la placa cantidades variables de 3D6 (en el intervalo de 50 ug/ml a 10 ng/ml). Después del lavado, se añadió HRP de cabra anti-ratón a la placa ELISA, se lavó y se reveló usando OPD. La absorbancia se detectó a 490 nm y las curvas de unión se ajustaron usando una curva logarítmica de 4 parámetros para determinar los

valores de EC50 (Tabla 18). 3D6 se unió a los MTBR 1-3 de forma relativamente equivalente, con valores de EC50 de 72.5, 35.5 y 25.1 ng/ml respectivamente. Sin embargo, la unión a MTBR 4 fue aproximadamente 60-170 veces menor, con una EC50 aparente de 4309 ng/ml. Las variaciones de secuencia en el epítipo repetido en MTBR 4 de MTBR 1, 2, 3 y 4 pueden explicar la unión más débil a MTBR 4.

[00615] Tabla 18.

Número de Repetición de Microtúbulos	Aminoácidos (usando la numeración de la isoforma de longitud total de tau SEQ ID NO:1)	EC50 (ng/ml anticuerpo)
1	244-274	72.5
2	275-305	35.5
3	306-336	25.1
4	337-368	4309

[00616] Para dilucidar más de cerca los aminoácidos específicos responsables de la unión de 3D6, se realizó el mapeo de sustitución mediante micromatrices utilizando el péptido NVKSKIGSTENLKHQPG (SEQ ID NO: 184), que es la secuencia para los residuos 255-271 utilizando la numeración de la isoforma tau de longitud completa. El ensayo intercambió cada uno de los aminoácidos en la secuencia del péptido con los 20 aminoácidos, para determinar con un alto grado de precisión el epítipo central de 3D6. La micromatriz se imprimió con todos los péptidos por triplicado, junto con los péptidos de control de HA para garantizar el rendimiento del ensayo. Para realizar el ensayo, la matriz se incubó con 3D6 (10 ug/ml) en tampón de bloqueo, se lavó con PBS-T, seguido de incubación con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con DyLight-680. Además, las micromatrices se incubaron con el anticuerpo anti-HA 12CA5 conjugado directamente con DyLight-800. Las micromatrices se escanearon usando un escáner de LiCor y las intensidades de los triplicados se promediaron.

[00617] Los efectos de sustitución para cada residuo se calcularon determinando la proporción de unión a 3D6 perdida cuando el residuo nativo se

mutó a la suma de todos los otros 19 aminoácidos. Los resultados se representan en la Figura 12A. La pérdida de unión superior al 50% (línea discontinua) significa un residuo importante para la unión de 3D6. La unión del péptido sonda (residuos 255-271 de la isoforma 441aa) con 3D6 reveló un patrón de sustitución de epítipo con un motivo central conservado KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188), enmarcado por tramos variables N- y C-terminales NVKS (SEQ ID NO: 189) y QPG (SEQ ID NO: 190), los cuales no son importantes para la unión. Dentro de este epítipo central, los residuos que no permiten la sustitución son Lys⁵, Asn¹¹, y His¹⁴; además, la posición 13 demuestra una tolerancia de sustitución reducida para residuos distintos de Lys y His. Además de estos importantes residuos, Ser⁸ solo permite una sustitución limitada. Esto da como resultado un epítipo discontinuo de KXXSXXNX (K/H) H (SEQ ID NO: 191) como se muestra en la Figura 12B. Las secciones pertinentes de las repeticiones de unión de microtúbulos de tau se presentan alineadas, con importantes residuos de unión de 3D6 resaltados. Cuando se compara con las repeticiones de microtúbulos en tau, los residuos importantes están presentes en todas las repeticiones, con la excepción de la penúltima posición en el epítipo central (K/H, indicado por ^). En esta posición, la repetición 4 contiene una treonina, que puede ser responsable de la unión de ELISA 3D6 inferior. El epítipo central se define en KIGSTENLKH (SEQ ID NO: 188, residuos 259-268 de SEQ ID NO: 1, en la repetición 1 de MBTR), KCGSKDNIKH (SEQ ID NO: 192, residuos 290-299 de SEQ ID NO: 1, en la repetición 2 de MBTR), KCGSLGNIHH (SEQ ID NO: 193, residuos 321-330 de la SEQ ID NO: 1, en la repetición 3 de MBTR), con menor unión en KIGSLDNITH (SEQ ID NO: 194, residuos 353-362 de SEQ ID NO: 1, en la repetición 4 de MBTR).

[00618] Ejemplo 15 El 3D6 de ratón se une a muestras de pacientes de pacientes con enfermedad de Alzheimer, experimentos de inmunohistoquímica

[00619] Los bloques de autopsia de muestras de cerebro humano congeladas frescas (~ 0.5 g) se incrustaron en OCT y se cortaron usando un criostato para generar secciones de 10 µm. Las secciones se colocaron en una solución de glucosa oxidasa y beta D-glucosa, en presencia de azida de sodio,

para bloquear la peroxidasa endógena. Una vez preparadas las secciones de tejido, se tiñeron con 3D6 a las concentraciones indicadas utilizando un polímero anti-ratón y un kit de detección basado en DAB (kit de detección de refinamiento Leica BOND) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Figura 13.

[00620] En el tejido de la AD, 3D6 se une a las características patológicas distintivas de la tau, incluidos los ovillos neurofibrilares y las neuritas distróficas. Además, 3D6 se une a tau intracelular soluble; esto es evidente por la tinción presente en el tejido de control sano normal.

[00621] Ejemplo 16 3D6 de ratón une agregados de tau solubles, entrecruzando experimentos de Espectrometría de Masas MALDI de alta masa

[00622] Para determinar si 3D6 se unía a una o varias subunidades de tau, se utilizó espectrometría de masas MALDI de alta masa de reticulación para evaluar la estequiometría de unión. La reticulación permite el análisis directo de la interacción no covalente. Al mezclar una muestra de proteína que contiene interacciones no covalentes con una mezcla de entrecruzamiento (Bich, C et al. *Anal. Chem.*, 2010, 82 (1), págs. 172-179), es posible detectar específicamente complejo con alta sensibilidad. En este ensayo, se probó la interacción de 3D6 con agregados de tau solubles. Se generaron agregados de tau solubles mediante incubación de tau recombinante de longitud completa con cantidades equimolares de heparina de bajo peso molecular durante 3d a 37°C. Después de la incubación, la tau insoluble y soluble se separó mediante centrifugación a 10,000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se resolvió después mediante cromatografía de exclusión por tamaño, y los picos agregados (mayores a 100 kDa) se recolectaron y concentraron.

[00623] 3D6 se mezcló con diversas proporciones de agregado de tau soluble y se detectó mediante espectrometría de masas MALDI de alta masa. Además, se realizaron experimentos de control de componentes individuales para permitir el etiquetado correcto de los picos detectados. El análisis se realizó en modo lineal positivo con el módulo de interacción HM4 (CovalX) con un láser de nitrógeno estándar, centrándose en el rango de masa de 0-1500 kDa.

[00624] Los resultados se muestran en la Figura 14. En los resultados de control (no reticulados), tanto tau como 3D6 se detectan como entidades individuales de 40.93 y 146.938 kDa, respectivamente. Sin embargo, cuando se reticula, el pico de anticuerpo para 3D6 desaparece, mientras que aparecen dos nuevos picos que representan la interacción de 3D6 con uno y dos antígenos (a 194.788 y 228.963, respectivamente. Como se detectó en el recuadro de superposición, el pico de 3D6 a 146.938 kDa está notablemente ausente de Estos datos sugieren que 3D6 se une muy fuertemente a los agregados solubles de tau, y lo lleva a cabo mediante la unión de uno o dos complejos por anticuerpo.

[00625] Ejemplo 17 El 3D6 de ratón interrumpe la siembra de tau en un modelo de enfermedad in vivo de la patología de la enfermedad de Alzheimer

[00626] La capacidad de 3D6 para interrumpir la siembra de tau se investigó en un modelo de enfermedad *in vivo* de la propagación de la patología de la AD. Se generaron semillas patológicas usando homogeneizados de tronco cerebral de ratones hTauP301L en etapa terminal o controles de tipo salvaje. Para inducir patología, se inyectaron semillas unilateralmente en el hipocampo de ratones de 3.5 meses de edad, mucho antes del inicio de la progresión de la patología natural. Para probar la capacidad de los anticuerpos para impactar la siembra de tau, los anticuerpos se preincubaron antes de la inyección. Después de un mes, se evaluó la cantidad de siembra en el lado ipsilateral de los ratones mediante inmunorreactividad de AT8; se determinó el número de neuronas por sección dentro del hipocampo.

[00627] Los resultados se muestran en la Figura 15. En comparación con el control de isotipo, la preincubación de semillas de tau con 3D6 pudo disminuir significativamente la cantidad de siembra detectada en ratones después de un mes, lo que sugiere la interrupción de la internalización de tau proximalmente al sitio de inyección y sugiere que 3D6 puede perjudicar la captación y propagación de tau.

[00628] Ejemplo 18. 3D6 de ratón y variantes humanizadas interrumpen la interacción de tau con heparina *in vitro*

[00629] Varios estudios indican que la internalización de tau en las células está mediada por la interacción inicial de tau con proteoglicanos de sulfato de heparina asociados a la superficie (HSPG), y que esta interacción es un paso inicial esencial que conduce a la captación, siembra y propagación de tau (Holmes et al., PNAS, 110 (33), 2013; Katsinelos et al., *Cell Rep*, 23, 2018). Por tanto, una propiedad favorable de un anticuerpo anti-tau terapéutico sería la capacidad de bloquear la interacción entre tau y heparina que estaría presente en la superficie de las células.

[00630] Para probar la capacidad de las variantes 3D6 murinas y humanizadas para interrumpir la interacción tau con heparina, las placas ELISA recubiertas con heparina de bajo peso molecular se bloquearon primero con BSA al 2% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST. Después del bloqueo, las placas se incubaron con tau recombinante biotinilada junto con las concentraciones indicadas de anticuerpo no marcado en BSA al 1%/PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y luego se incubaron con estreptavidina-HRP en BSA al 0.1%/PBS durante 45 min. A continuación, las placas se lavaron y revelaron con OPD y se midió la absorbancia a 490 nm. Las curvas de inhibición se analizaron utilizando un ajuste logarítmico de 4 parámetros.

[00631] Los resultados se muestran en la Figura 16 y la Tabla 19. Las formas murinas, así como ambas formas humanizadas de 3D6 probadas en el ensayo mostraron la capacidad de bloquear la interacción tau/heparina, lo que indica que el epítipo 3D6 es importante para esta interacción y que los anticuerpos son capaces de inhibir la interacción. Esto sugiere la capacidad de interrumpir la captación de tau en las células. Aunque todos los anticuerpos probados mostraron actividad inhibidora, la variante hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 retuvo una actividad más cercana a la forma murina del anticuerpo ($IC_{50} = 422.7$ pM, en comparación con 409.2 pM para murino). Por el contrario, hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 demostró una menor actividad inhibidora ($IC_{50} = 564.6$ pM), en comparación con hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4, lo que indica que hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 tiene un mayor grado de retención de propiedades de anticuerpo murino y sugiere una

mejora de actividad inhibidora de hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 debido a las variantes de aminoácidos en la CDR en la cadena ligera.

[00632] Tabla 19

Anticuerpo	IC ₅₀ (pM)
3D6 murino	409.2
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	564.6
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	422.7

5 **[00633] Ejemplo 19** Las variantes humanizadas 3D6 se unen a formas fibrilares de tau

10 **[00634]** Se generaron fibrillas de tau recombinantes mediante incubación con cantidades equimolares de heparina de bajo peso molecular con tau de 4 repeticiones ("tau fibrilar") o crecimiento de siembra de tau de 3 repeticiones y 4 repeticiones ("fibrillas mixtas"). Tau se incubó durante 3-5 días a 37°C. Para aislar las fibrillas, las muestras preparadas se ultracentrifugaron a 100,000 xg durante 30 minutos. Los gránulos se resuspendieron en su volumen original antes del almacenamiento a -80°C antes de su uso.

15 **[00635]** Las placas de ELISA se recubrieron con fibrillas preformadas (durante la noche a 4°C en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6), se lavaron y se bloquearon con 1% BSA en PBS. Después del bloqueo, las placas se incubaron con las concentraciones indicadas de anticuerpo primario biotinilado en 0.1% BSA/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y luego se incubaron con estreptavidina-HRP en 0.1%BSA/PBS durante 45 min.

20 A continuación, las placas se lavaron y revelaron con OPD y se midió la absorbancia a 490 nm. Las curvas de unión se analizaron utilizando un ajuste logarítmico de 4 parámetros.

25 **[00636]** Los resultados se muestran en la Figura 17 y la Tabla 20. Ambas formas humanizadas de 3D6 ensayadas en el ensayo mostraron una fuerte unión a formas fibrilares de tau, tanto si las fibrillas contenían tau 4R solamente como tau tanto 3R como 4R. La variante hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 mostró una preferencia por la unión a ambas especies (EC₅₀ = 191.8 pM) en comparación

con hu3D6VHv1bA11/hu3D6VLv2 ($EC_{50} = 236.7$ pM), lo que indica una mejora en la capacidad de unión de variantes de hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4 en la CDR de la cadena ligera.

[00637] Tabla 20

anticuerpo	Unión a fibrillas de tau 4R: EC_{50} (pM)
hu3D6VHv1bA11/L2-DIM4	191.8
hu3D6VHv1bA11/ hu3D6VLv2	236.7

5

[00638] Ejemplo 20 CDR ejemplares

[00639] En la Tabla 21 se muestran ejemplos de CDR de anticuerpos de la invención.

[00640] Tabla 21: CDR ejemplares

CDR y Definición	Secuencia de Aminoácidos de CDR	SEQ ID NO:	VH o VL ejemplar en la que la CDR está presente
HCDR1Kabat/Chothia	GFNIKDYLLH	8	3D6 VH de Ratón
HCDR2 de Kabat	WIDPENGDTVYDPKFQG	9	3D6 VH de Ratón
HCDR3 Kabat:	LDF	10	3D6 VH de Ratón
LCDR1 de Kabat	KSSQSLLDSGKTYLN	12	3D6 VL de Ratón
LCDR2 de Kabat	LVSKLDS	13	3D6 VL de Ratón
LCDR3 de Kabat:	WQGTHFPYT	14	3D6 VL de Ratón
CDR-H1 de Kabat	DYYLH	32	3D6 VH de Ratón
CDR-H1 de Chothia	GFNIKDY	33	3D6 VH de Ratón
CDR-H2 de Chothia	DPENG	34	3D6 VH de Ratón
CDR-H2 de AbM	WIDPENGDTV	35	3D6 VH de Ratón
CDR-L1 de Contacto	KTYLNWL	36	3D6 VL de Ratón
CDR-L2 de Contacto	RLIYLVSKLD	37	3D6 VL de Ratón
CDR-L3 de Contacto	WQGTHFPY	38	3D6 VL de Ratón
CDR-H1 de Contacto	KDYYLH	39	3D6 VH de Ratón
CDR-H2 de Contacto	WIGWIDPENGDTV	40	3D6 VH de Ratón
CDR-H3 de Contacto	STLD	41	3D6 VH de Ratón
CDR-H1 de Kabat-Chothia	GFTIKDYLLH	42	hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1e, y hu3D6VHv1f
CDR-H2 de Kabat	WIDPEDGDTVYAPKFQG	43	hu3D6VHv5 y hu3D6VHv1bA11B6H3
CDR-H1 de Kabat-Chothia	GFNFKDYYLH	58	hu3D6VH1c
CDR-H1 de Kabat-Chothia	GYTFTDYYLH	59	hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c
CDR-H1 de Kabat-Chothia	GYNFKDYYLH	60	hu3D6VHv3b y hu3D6VHv4b
CDR-H2 de Kabat	WVDPEDGDTVYAPKFQG	61	hu3D6VHv1bA11B6G2
CDR-H2 de Kabat	WIDPENGDTVYDEKFQG	62	hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, y hu3D6VHv4b
CDR-H2 de Kabat	WVDPEDGDTVYAEKFQG	63	hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c
CDR-H2 de Kabat	WIDPENGDTVYAEKFQG	64	hu3D6VHv1e
CDR-H3 de Kabat	LDY	65	hu3D6VHv1f
CDR-H1 compuesto de Kabat/Chothia	GLNIKDYIIH	67	6A10 VH de Ratón
CDR-H2 de Kabat	WIDPENDDTEYAPKFQG	68	6A10 VH de Ratón
CDR-H3 de Kabat	LDY	69	6A10 VH de Ratón
CDR-H1 Compuesto de Kabat-Chothia	GFTIKDYLLH	86	hu3D6VHvb4 y hu3D6VHvb5
CDR-H2 de Kabat	WIDPENGDTIYDPKFQG	87	hu3D6VHvb3 y hu3D6VHvb4
CDR-H2 de Kabat	WIDPEDGETIYDPKFQG	88	hu3D6VHvb5
CDR-L1 de Kabat	RSSQSLLDSGKTYLN	89	hu3D6VLvb3
CDR-H2 de Kabat	WIDPEDGETIYDPKFQG	92	hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7

CDR y Definición	Secuencia de Aminoácidos de CDR	SEQ ID NO:	VH o VL ejemplar en la que la CDR está presente
CDR-H2 de Kabat	WIDPENGDTVYEPKFQG	149	h3D6VHvb8 y h3D6VHvb9
CDR-L2 de Kabat	LVSKDDS	150	hu3D6VLv2 L54D y hu3D6VLv2 L37Q_L54D
CDR-L2 de Kabat	LVSKGDS	151	hu3D6VLv2 L54G y hu3D6VLv2 L37Q_L54G
CDR-L2 de Kabat	LVSKNDS	152	hu3D6VLv2 L54N
CDR-L2 de Kabat	LVSKEDS	153	hu3D6VLv2 L54E y hu3D6VLv2 L37Q_L54E
CDR-L2 de Kabat	EVSKLDS	154	hu3D6VLv2 L50E
CDR-L2 de Kabat	LVSKQDS	155	hu3D6VLv2 L54Q
CDR-L2 de Kabat	DVSKLDS	156	hu3D6VLv2 L50D y hu3D6VLv2 L37Q_L50D
CDR-L2 de Kabat	LVSKKDS	157	hu3D6VLv2 L54K
CDR-L2 de Kabat	LVSKRDS	158	hu3D6VLv2 L54R y hu3D6VLv2 L37Q_L54R
CDR-L2 de Kabat	LVSKTDS	159	hu3D6VLv2 L54T y hu3D6VLv2 L37Q_L54T
CDR-L2 de Kabat	GVSKLDS	160	hu3D6VLv2 L50G y hu3D6VLv2 L37Q_L50G
CDR-L2 de Kabat	LVSKVDS	161	hu3D6VLv2 L54V
CDR-L2 de Kabat	LVSKSDS	162	hu3D6VLv2 L54S
CDR-L2 de Kabat	LVGKLDS	163	hu3D6VLv2 S52G y hu3D6VLv2 L37Q_S52G
CDR-L2 de Kabat	VVSKLDS	164	hu3D6VLv2 L50V
CDR-L2 de Kabat	GVSKRDS	165	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R y hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q
CDR-L2 de Kabat	GVSKGDS	166	hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G y hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q
CDR-L2 de Kabat	LVGKGDS	167	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G
CDR-L2 de Kabat	LVGKRDS	168	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R y hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q
CDR-L2 de Kabat	LVGKTDS	169	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T
CDR-L2 de Kabat	LVGKDDS	170	hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D y hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q
CDR-L2 de Kabat	DVSKGDS	171	in hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G y hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q
CDR-L2 de Kabat	DVSKRDS	172	hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R y hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q

CDR y Definición	Secuencia de Aminoácidos de CDR	SEQ ID NO:	VH o VL ejemplar en la que la CDR está presente
CDR-L2 de Kabat	EVSKGDS	173	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G
CDR-L2 de Kabat	EVSKRDS	174	hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R
CDR-L2 de Kabat	VVSKDDS	175	hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q

Listado de Secuencias

[00641] P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTED
5 GSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTP
SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANA
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKV
AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
10 KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSG
DTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

[00642] P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK
15 KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGY
SSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLK
NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV
DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI
ETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLA
20 DEVSASLAKQGL

[00643] P10636-6 (4RON tau humana) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGDTP
SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANA
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKV
25 AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
NVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE

KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSG
DTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

[00644] P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTED
5 GSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTP
SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANA
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKV
AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDL
SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
10 HKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADE
VSASLAKQGL

[00645] P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTED
GSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDK
15 KAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGY
SSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLK
NVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
LDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGD
TSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL

20 **[00646]** P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEAGIGDTP
SLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANA
TRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKV
AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDL
25 SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
HKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSSTGSIDMVDSPQLATLADE
VSASLAKQGL

[00647] SEQ ID NO:7; Secuencia de aminoácidos de 3D6 VH Murino

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDY YLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENG
30 DTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSED TAVYFCSTLDFWGQGTTLT VSS

[00648] SEQ ID NO:8; HCDR1 de Kabat/Chothia:

GFNIKDYYLH

[00649] SEQ ID NO:9; HCDR2 de Kabat:

WIDPENGDTVYDPKFQG

[00650] SEQ ID NO:10; HCDR3 de Kabat:

5 LDF

[00651] SEQ ID NO:11; Secuencia de Aminoácidos de 3D6 VL Murino:

DVVMQTPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSK
LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHFPYTFGGGKLEIK

[00652] SEQ ID NO:12; LCDR1 Murino de Kabat:

10 KSSQSLLDSDGKTYLN

[00653] SEQ ID NO:13; LCDR2 Murino de Kabat:

LVSKLDS

[00654] SEQ ID NO:14; LCDR3 Murino de Kabat:

WQGTTHFPYT

15 **[00655]** SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSKASGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

[00656] SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWMGWIDPEN
20 GDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

[00657] SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

[00658] SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGRATITADTSTDYAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

[00659] SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPEDG
DTVYAPKFQGRATITADTSTDYAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTLTVSS

30 **[00660]** SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRILIYLVSK
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00661] SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRILIYLVSK
5 KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00662] SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRILIYLVSK
KLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00663] SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

10 DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRILIYLVSKL
DSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00664] SEQ ID NO:24; acceptor variable de cadena pesada Acc.No.
BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFGSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGI
15 ATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSED TAVYYCARGKGEFEGMDVWGQGT
TVVSS

[00665] SEQ ID NO:25; acceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT
No. IGHV1-69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPED
20 GETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED TAVYYCAT

[00666] SEQ ID NO:26; acceptor variable de cadena pesada Acc.No. IMGT
No. IGKJ1*01

QHWGQGTLTVVSS

[00667] SEQ ID NO:27; acceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No.
25 IGKV2-30*02 Acc. No. IMGT No. IGKV2-30*02

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRILIYKV
SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP

[00668] SEQ ID NO:28; acceptor variable de cadena ligera Acc. No. IMGT No.
IGKJ2*01

30 YTFGQGTKLEIK

[00669] SEQ ID NO:29; Acceptor variable de cadena ligera Acc. No.

AAZ09048.1

DVVMTQSPLSLTVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYRV
 SHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTYWPLTFGQGTKLEIK

[00670] SEQ ID NO:30; Secuencia de ácido nucleico de 3D6 VH murino:

5 GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGCCAGGGGCCTTAGT
 CAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATTTGCACTGGGT
 GAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAAT
 GGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACA
 CATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
 10 CGTCTATTTCTGTTCTACCCTTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCT
 CCTCA

[00671] SEQ ID NO:31; Secuencia de ácido nucleico de 3D6 VL murino:

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCATTGGACAACCAG
 CCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATAT
 15 TTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGT
 GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACA
 GATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTG
 CTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA
 AAACGT

20 **[00672]** SEQ ID NO:32; CDR-H1 Murino de Kabat
 DYYLH

[00673] SEQ ID NO:33; CDR-H1 Murino de Chothia
 GFNIKDY

[00674] SEQ ID NO:34; CDR-H2 Murino de Chothia
 25 DPENGD

[00675] SEQ ID NO:35; CDR-H2 Murino de AbM
 WIDPENGDTV

[00676] SEQ ID NO:36; CDR-L1 Murino de Contacto
 KTYLNWL

30 **[00677]** SEQ ID NO:37; CDR-L2 Murino de Contacto
 RLIYLVSKLD

[00678] SEQ ID NO:38; CDR-L3 Murino de Contact
WQGTHFPY

[00679] SEQ ID NO:39; CDR-H1 Murino de Contacto
KDYYLH

5 **[00680]** SEQ ID NO:40; CDR-H2 Murino de Contacto
WIGWIDPENGDTV

[00681] SEQ ID NO:41; CDR-H3 Murino de Contact
STLD

10 **[00682]** SEQ ID NO:42; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia
GFTIKDYYLH

[00683] SEQ ID NO:43; CDR-H2 Alterno de Kabat
WIDPEDGDTVYAPKFQG

[00684] SEQ ID NO:44; secuencia de aminoácidos de consenso de VH de la
Figura 2 de PCT/IB2017/052544

15 EVQLVQSGAEVVXPGALVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGXATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

[00685] SEQ ID NO:45; secuencia de aminoácidos de consenso de VL de la
Figura 3 de PCT/IB2017/052544

20 DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGKLEIKR

[00686] SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
DTVYAPKFQGRATITADTSTDYALELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

[00687] SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
DTVYAPKFQGRATITADTSTDYALELGLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

[00688] SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVVKRPGALVKISCKASGFNFKDYLLHWVRQRPEQGLEWMGWIDPEN
GDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

30 **[00689]** SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYYLHWVRQRPEQGLEWMGWVDPED
GDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTLTVSS

[00690] SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENG
5 TVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLeLGSLTSEDVAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

[00691] SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPQGQGLEWIGWVDPEDG
DTVYAEKFQGRVTITADTSTD TAYMELGSLTSEDVAVYFCSTLDYWGQGTTTLTVSS

[00692] SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

10 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPGKGLEWMGWIDPENG
DTVYDPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

[00693] SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQAPGKGLEWMGWIDPEN
GDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

15 **[00694]** SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQAPGKGLEWMGWVDPED
GDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

[00695] SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQRPQGKGLEWIGWIDPENG
20 DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLELGSLTSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

[00696] SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQRPQGKGLEWMGWIDPEN
GDTVYDEKFQGRVTITADTSTD TAYLELGSLTSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

[00697] SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

25 EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQRPQGKGLEWMGWVDPED
GDTVYAEKFQGRVTITADTSTD TAYLELGSLTSEDVAVYYCSTLDFWGQGTLTVSS

[00698] SEQ ID NO:58; CDR-H1 Alterno de Kabat-Chothia (como en
hu3D6VH1c).

GFNFKDYYLH

30 **[00699]** SEQ ID NO:59; CDR-H1Alterno de Kabat-Chothia, (como en
hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

GYTFTDYLLH

[00700] SEQ ID NO:60; CDR-H1 Alternativo de Kabat-Chothia (como en hu3D6VHv3b y hu3D6VHv4b)

GYNFKDYLLH

5 **[00701]** SEQ ID NO:61; CDR-H2 Alternativo de Kabat (como en hu3D6VHv1bA11B6G2).

WVDPEDGDTVYAPKFQG

[00702] SEQ ID NO:62, CDR-H2 Alternativo de Kabat (como en hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, y hu3D6VHv4b).

10 WIDPENGDTVYDEKFQG

[00703] SEQ ID NO:63; CDR-H2 Alternativo de Kabat como en hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, y hu3D6VHv4c).

WVDPEDGDTVYAEKFQG

[00704] SEQ ID NO:64; CDR-H2 Alternativo de Kabat (como en hu3D6VHv1e).

15 WIDPENGDTVYAEKFQG

[00705] SEQ ID NO:65; CDR-H3 Alternativo de Kabat (como en hu3D6VHv1f)

LDY

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

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHVWKQRPEQGLEWIGWIDPEND

20 DTEYAPKFQGRATLTDTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCTPLDYWGQGTSVTVSS

[00706] SEQ ID NO:67; CDR-H1 de Compuesto de Kabat/Chothia del anticuerpo de ratón 6A10.

GLNIKDYYIH

[00707] SEQ ID NO:68; CDR-H2 de Kabat del anticuerpo de ratón 6A10.

25 WIDPENDDTEYAPKFQG

[00708] SEQ ID NO:69; CDR-H3 de Kabat del anticuerpo de ratón 6A10

LDY

[00709] SEQ ID NO:70; Plantilla de estructura VH de Mus (PDB#1CR9_H)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYIQVWKQRPEQGLEWIGWIDPENG

30 NSEYAPRFQGKATMTADTLSTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQGTTLTVS

S

[00710] SEQ ID NO:71; secuencia de consenso de aminoácidos de VH de las Figuras 4A y 4B de PCT/IB2017/052544

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLTVSS

5 **[00711]** SEQ ID NO:72; cadena pesada de anticuerpo quimérico de 3D6

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYHLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
10 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00712] SEQ ID NO:73; cadena ligera de anticuerpo quimérico de 3D6

15 DVVMTQTPLTSLVTLGTPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSK
LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00713] SEQ ID NO:74; secuencia de aminoácidos de modelo estructural de variable de cadena pesada Acc.No. 5MYX-VH_mSt

20 EVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDG
DTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYIVYWGQGTLTVSS
A

[00714] SEQ ID NO:75; secuencia de aminoácidos de aceptor variable de cadena pesada Acc.No. 2RCS-VH_huFrwk

25 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWKQRPEQGLEWIGRIDPANG
NTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCASYYGIYWGQGTTTLTVSS

[00715] SEQ ID NO:76; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb1

30 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYHLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTTLTVSS

[00716] SEQ ID NO:77; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb2

EVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGRATITADTSTDYALELSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

5 **[00717]** SEQ ID NO:78; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb3

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTIYDPKFQGRATITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

10 **[00718]** SEQ ID NO:79; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb4

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPENG
DTIYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[00719] SEQ ID NO:80; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb5

15 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
ETIYDPKFQGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS

[00720] SEQ ID NO:81; secuencia de aminoácidos de modelo estructural variable de cadena ligera Acc.No. 5MYX-VL_mSt

20 DVVLTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYVVS
LDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPFTFGSGTKLEIK

[00721] SEQ ID NO:82; secuencia de aminoácidos de aceptor variable de cadena ligera Acc.No. ARX71335-VL_huFrwk

DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCEQGTHFPLTFGAGTKLELK

25 **[00722]** SEQ ID NO:83; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb1

DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSK
LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVHYCWQGTHFPYTFGAGTKLELK

30 **[00723]** SEQ ID NO:84; secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb2

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGAGTKLEIK

[00724] SEQ ID NO:85; secuencia de aminoácidos de región variable de
cadena ligera del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VLvb3

5 DVVMTQSPLSLSVTLGEPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWLQRPQGQSPRRLIYLVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

[00725] 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)

10 GFTIKDYLLH

[00726] SEQ ID NO:87; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alternativo de
Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb3 y hu3D6VHvb4)

WIDPENGDTIYDPKFQG

[00727] SEQ ID NO:88; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alternativo de
Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb5)

15 WIDPEDGETIYDPKFQG

[00728] SEQ ID NO:89; secuencia de aminoácidos de un CDR-L1 Alternativo de
Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VLvb3)

RSSQSLLDSDGKTYLN

20 **[00729]** SEQ ID NO:90; secuencia de aminoácidos de región variable de
cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb6

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
ETVYDPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYFCSTLDFWGQGT LVTVSS

[00730] SEQ ID NO:91; secuencia de aminoácidos de región variable de
cadena pesada del anticuerpo humanizado 3D6 hu3D6VHvb7

25 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYLLHWVRQRPKGKLEWIGWIDPEDG
ETVYDPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGT LVTVSS

[00731] SEQ ID NO:92; secuencia de aminoácidos de un CDR-H2 Alternativo de
Kabat de un anticuerpo humanizado 3D6 (como en hu3D6VHvb6 y hu3D6VHvb7)

30 WIDPEDGETVYDPKFQG

[00732] SEQ ID NO:93; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L54D, también conocido como L2-DIM21

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
KDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00733] SEQ ID NO:94; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

5 variante L54G, también conocido como L2-DIM7

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
KGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00734] SEQ ID NO:95; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L45N

10 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
KNDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00735] SEQ ID NO:96; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L54E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
15 KEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00736] SEQ ID NO:97; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L50E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYEVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

20 **[00737]** SEQ ID NO:98; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L54Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
KQDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00738] SEQ ID NO:99; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

25 variante L50D

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYDVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00739] SEQ ID NO:100; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L54K

30 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLVS
KKDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00740] SEQ ID NO:101; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L54R

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLV
KRD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

5 **[00741]** SEQ ID NO:102; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L54T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLV
KTD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

10 **[00742]** SEQ ID NO:103; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L50G, también conocido como L2-DIM22

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYGV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00743] SEQ ID NO:104; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante I48G

15 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLGYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00744] SEQ ID NO:105; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante I48D

20 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLDYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00745] SEQ ID NO:106; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRGIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

25 **[00746]** SEQ ID NO:107; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante Y49E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIELV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

30 **[00747]** SEQ ID NO:108; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L54V

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLV
KVD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00748] SEQ ID NO:109; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L54S

5 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLV
KSD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00749] SEQ ID NO:110; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante S52G, también conocido como L2-DIM9

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYLV
10 KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00750] SEQ ID NO:111; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47N

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRNIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

15 **[00751]** SEQ ID NO:112; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47D

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRDIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

20 **[00752]** SEQ ID NO:113; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRREIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00753] SEQ ID NO:114; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47P

25 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRPIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00754] SEQ ID NO:115; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L47T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRTIYLV
30 KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIK

[00755] SEQ ID NO:116; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L47S

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRSIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00756] SEQ ID NO:117; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

5

variante L47A

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRAIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00757] SEQ ID NO:118, región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L50V

10

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPRRLIYVVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00758] SEQ ID NO:119; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_L50G_L54R, también conocido como L2-DIM1

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYGV
15 KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00759] SEQ ID NO:120; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_L50G_L54G, también conocido como L2-DIM2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYEV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

20

[00760] SEQ ID NO:121; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_S52G_L54G, también conocido como L2-DIM3

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00761] SEQ ID NO:122; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

25

variante L37Q_S52G_L54R, también conocido como L2-DIM4

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00762] SEQ ID NO:123; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_S52G_L54T, también conocido como L2-DIM5

30

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPYTFGGG TKLEIK

[00763] SEQ ID NO:124; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_S52G_L54D, también conocido como L2-DIM6

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

5 **[00764]** SEQ ID NO:125; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L54R

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

10 **[00765]** SEQ ID NO:126; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L54G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00766] SEQ ID NO:127; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L54D, también conocido como L2-DIM12

15 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00767] SEQ ID NO:128; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50G, también conocido como L2-DIM13

20 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYGVG
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00768] SEQ ID NO:129; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50D, también conocido como L2-DIM14

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

25 **[00769]** SEQ ID NO:130; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L54T

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPYTFGGGGTKLEIK

30 **[00770]** SEQ ID NO:131; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_S52G

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00771] SEQ ID NO:132; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50D_L54G, también conocido como L2-DIM17

5 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
KGDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00772] SEQ ID NO:133; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50D_L54R, también conocido como L2-DIM18

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
10 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00773] SEQ ID NO:134; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50E_L54G, también conocido como L2-DIM19

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYEV
15 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00774] SEQ ID NO:135; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50E_L54R, también conocido como L2-DIM20

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYEV
20 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIK

[00775] SEQ ID NO:136; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50G_L54R_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYGV
25 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGT
KLEIK

[00776] SEQ ID NO:137; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_L50G_L54G_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYGV
30 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGT
KLEIK

[00777] SEQ ID NO:138; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante L37Q_S52G_L54R_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV
30 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGT
KLEIK

[00778] SEQ ID NO:139; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_S52G_L54D_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVG
KDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIK

[00779] SEQ ID NO:140; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

5 variante L37Q_L50D_L54G_G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
KGD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIK

[00780] SEQ ID NO:141; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_L50D_L54R_G100Q

10 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYDVS
KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIK

[00781] SEQ ID NO:142; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q_L50V_L54D_G100Q

15 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYVVS
KDDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIK

[00782] SEQ ID NO:143; región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

variante L37Q, también conocido como L2-DIM8

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS
KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

20 **[00783]** SEQ ID NO:144 región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2
variante G100Q

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQQRPGQSPRRLIYLVS
KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGGTKLEIK

[00784] SEQ ID NO:145 región variable de cadena ligera de un hu3D6VLv2

25 variante L37Q_L54E

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVS
KEDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGGTKLEIK

[00785] SEQ ID NO:146; heavy chain variable region of a hu3D6VHv1bA11

variante D60E, también conocido como h3D6VHvb8

30 EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPGQGLEWIGWIDPENG
DTVYEPKFQGRATITADTSTD TAYLQLGSLTSED TAVYFCSTLDFWGQGT LVT VSS

[00786] SEQ ID NO:147 heavy chain variable region of a hu3D6VHv1bA11 variante L82cV

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPQGQGLEWIGWIDPENG
DTVYDPKFQGRATITADTSTDYALQLGSVTSEDYAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

5 **[00787]** SEQ ID NO:148; heavy chain variable region of a hu3D6VHv1bA11 variante D60E_L80M_Q81E_L82cV_T83R, también conocido como h3D6VHvb9

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYHLHWVRQRPQGQGLEWIGWIDPENG
DTVYEPKFQGRATITADTSTDYAMELGSVRSEDYAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSS

10 **[00788]** SEQ ID NO:149; secuencia de aminoácidos de una CDR-H2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en h3D6VHvb8 y en h3D6VHvb9)

WIDPENGDTVYEPKFQG

15 **[00789]** SEQ ID NO:150; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54D y en hu3D6VLv2 L37Q_L54D):

LVSKDDS

[00790] SEQ ID NO:151; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54G y en hu3D6VLv2 L37Q_L54G):

20 LVSKGDS

[00791] SEQ ID NO:152; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54N):

LVSKNDS

25 **[00792]** SEQ ID NO:153; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54E y en hu3D6VLv2 L37Q_L54E):

LVSKEDS

[00793] SEQ ID NO:154; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50E):

30 EVSKLDS

[00794] SEQ ID NO:155; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54Q):

LVSKQDS

[00795] SEQ ID NO:156; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50D y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D):

DVSKLDS

[00796] SEQ ID NO:157; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54K):

LVSKKDS

[00797] SEQ ID NO:158; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54R y en hu3D6VLv2 L37Q_L54R):

LVSKRDS

[00798] SEQ ID NO:159; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54T y en hu3D6VLv2 L37Q_L54T):

LVSKTDS

[00799] SEQ ID NO:160; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50G y en hu3D6VLv2 L37Q_L50G):

GVSKLDS

[00800] SEQ ID NO:161; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54V):

LVSKVDS

[00801] SEQ ID NO:162; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L54S):

LVSKSDS

[00802] SEQ ID NO:163; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 S52G y en hu3D6VLv2 L37Q_S52G):

LVGKLDS

[00803] SEQ ID NO:164; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L50V):

VVSKLDS

5 **[00804]** SEQ ID NO:165; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R and hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54R_G100Q):

GVSKRDS

10 **[00805]** SEQ ID NO:166; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G y en hu3D6VLv2 L37Q_L50G_L54G_G100Q):

GVSKGDS

15 **[00806]** SEQ ID NO:167; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54G):

LVGKGDS

[00807] SEQ ID NO:168; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R y en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54R_G100Q):

20 LVGKRDS

[00808] SEQ ID NO:169; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54T):

LVGKTDS

25 **[00809]** SEQ ID NO:170; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D y en hu3D6VLv2 L37Q_S52G_L54D_G100Q):

LVGKDDS

30 **[00810]** SEQ ID NO:171; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54G_G100Q):

DVSKGDS

[00811] SEQ ID NO:172; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R y en hu3D6VLv2 L37Q_L50D_L54R_G100Q):

5 DVSKRDS

[00812] SEQ ID NO:173; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54G):

EVSKGDS

10 **[00813]** SEQ ID NO:174; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50E_L54R):

EVSKRDS

15 **[00814]** SEQ ID NO:175; secuencia de aminoácidos de una CDR-L2 alterna de Kabat de un anticuerpo 3D6 humanizado (como en hu3D6VLv2 L37Q_L50V_L54D_G100Q):

VVSKDDS

[00815] SEQ ID NO:176; secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada (IgG1: alotipo G1m17,1):

20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
25 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00816] SEQ ID NO:177; secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera (kappa):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00817] SEQ ID NO:178; secuencia de aminoácidos de una cadena pesada madura de una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 alotipo)

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVRQRPQGQGLEWIGWIDPENG
 5 DTVYDPKFQGRATITADTSTDYALQLGSLTSEDYAVYFCSTLDFWGQGTLLTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 10 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00818] SEQ ID NO:179; secuencia de aminoácidos de una cadena ligera madura de una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa)

15 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLLIYLVG
 KRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPYTFGGGTKLEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00819] SEQ ID NO:180; secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VHv1bA11 IgG1 alotipo G1m17) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el N-terminal

MMSFVSLLLVGILFHATQAEVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYLLHWVR
 QRPQGQGLEWIGWIDPENGDYVDPKFQGRATITADTSTDYALQLGSLTSEDYAVYFC
 STLDFWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 25 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 30 GK

[00820] SEQ ID NO:181; secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VLv2 variante L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el N-terminal.

MMSFVSLLLVGILFHATQADVVM TQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN
 5 WLQQRPGQSPRRLIYLVGKRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCWQ
 GTHFPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

[00821] SEQ ID NO:182; secuencia de nucleótidos que codifica a heavy chain of una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VHv1bA11 IgG1 G1m17 alotipo) con péptido señal de alfa-lactalbúmina bovina en el N-terminal

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTCCATGCCACCCAGG
 CCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTTGTGAAGCCAGGGGCCACAG
 TCAAGATCTCCTGTAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATCTGCACTGG
 15 GTGCGGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATTGATCCTGAG
 AATGGTGATACTGTGTATGACCCGAAGTTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAG
 ACACATCCACCGACACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCTGACATCTGAGGACAC
 TGCCGTCTATTTCTGTTCTACCCTGGACTTCTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCACAG
 TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTAGCAA
 20 GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
 CGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACAC
 CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
 GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCA
 25 CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
 TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
 GGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGAGAGAGGAGCAGTACAA
 CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
 30 GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC

CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
 TTCCAAACTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 5 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCCCGGGAAATGATGAGATCTCGAG

[00822] SEQ ID NO:183; secuencia de nucleótidos que codifica una cadena
 ligera de una variante de 3D6 humanizado (hu3D6VLv2 variante
 L37Q_S52G_L54R, L2-DIM4 kappa) con péptido señal de alfa-lactalbúmina
 10 bovina en el N-terminal

ATGATGTCCTTTGTCTCTCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTCCATGCCACCCAGG
 CCGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCTTTGCCCGTTACCCTTGGACAACCT
 GCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATA
 TTTGAATTGGTTGCAACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCACGGCGCCTAATCTATCTG
 15 GTGGGGCAAACGGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGG
 ACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTA
 TTGCTGGCAAGGCACACATTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGGACCAAGCTGGAA
 ATAAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
 GCTTAAGTCCGGAAGTGTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
 20 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA
 GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT
 GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGT
 GAGATCTCGAG

[00823] SEQ ID NO:184; secuencia de aminoácidos de una región de
 repetición de unión a microtúbulos de tau 1 (residuos de aminoácidos 255-271 de
 SEQ ID NO:1)

NVSKIGSTENLKHQPG

[00824] SEQ ID NO:185; secuencia de aminoácidos de una región de
 repetición de unión a microtúbulos de tau 2 (residuos de aminoácidos 286-302 de
 30 SEQ ID NO:1)

NVQSKCGSKDNIKHVPG

[00825] SEQ ID NO:186; secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 3 (residuos de aminoácidos 317-333 de SEQ ID NO:1)

5 KVTSCGSLGNIHHKPG

[00826] SEQ ID NO:187; secuencia de aminoácidos de una región de repetición de unión a microtúbulos de tau 4 (residuos de aminoácidos 349-365 de SEQ ID NO:1)

RVQSKIGSLDNITHVPG

10 **[00827]** SEQ ID NO:188; secuencia de aminoácidos un motivo central de tau unido por 3D6

KIGSTENLKH

[00828] SEQ ID NO:189; secuencia de aminoácidos de secuencia de tau N-terminal a un motivo central de tau unido por 3D6

15 NVKS

[00829] SEQ ID NO:190; secuencia de aminoácidos de secuencia de tau C-terminal a un motivo central de tau unido por 3D6

QPG

[00830] SEQ ID NO:191; secuencia de aminoácidos de epítipo de 3D6

20 KXXSXXNX(K/H)H

[00831] SEQ ID NO:192; secuencia de aminoácidos un motivo central de tau unido por 3D6

KCGSKDNIKH

[00832] SEQ ID NO:193; secuencia de aminoácidos un motivo central de tau unido por 3D6

25

KCGSLGNIHH

[00833] SEQ ID NO:194; secuencia de aminoácidos un motivo central de tau unido por 3D6

KIGSLDNITH