

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 728**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2016 PCT/EP2016/064465**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16207245**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2016 E 16733038 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3313877**

54 Título: **Anticuerpos anti-tau(pS422) humanizados y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

24.06.2015 EP 15173511

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

05.03.2021

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**EMRICH, THOMAS;
GRUENINGER, FIONA;
HUGENMATTER, ADRIAN;
MOESSNER, EKKEHARD;
DENGL, STEFAN;
GEORGES, GUY;
GOEPFERT, ULRICH;
JOCHNER, ANTON;
KETTENBERGER, HUBERT;
MOELLEKEN, JOERG;
MUNDIGL, OLAF;
NIEWOEHNER, JENS;
SCHLOTHAUER, TILMAN;
MOLHOJ, MICHAEL y
BRADY, KEVIN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 809 728 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-tau(pS422) humanizados y procedimientos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-tau(pS422) humanizados que se unen específicamente al fragmento de tau fosforilada de SEQ ID NO: 03 y a su uso para el tratamiento de enfermedades cerebrales.

10 ANTECEDENTES

La tau humana (proteína tau asociada a los microtúbulos (proteína de ovillos neurofibrilares, filamento helicoidal emparejado-tau, PHF-tau)) es una proteína asociada a los microtúbulos neuronales que se encuentra predominantemente en los axones y funciona para promover la polimerización de la tubulina y estabilizar los microtúbulos. Ocho isoformas (isoforma A, B, C, D, E, F, G, tau fetal) se encuentran en el cerebro humano, comprendiendo la isoforma más larga 441 aminoácidos (isoforma F, Uniprot P10636-8). La tau y sus propiedades también se describen por Reynolds, C.H., *et al.*, J. Neurochem. 69 (1997) 191-198.

La tau, en su forma hiperfosforilada, es el componente principal de los filamentos helicoidales emparejados (PHF), el componente básico de las lesiones neurofibrilares en el cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer (EA). La tau se puede fosforilar en sus residuos de serina o treonina por varias cinasas diferentes, incluyendo GSK3beta, cdk5, MARK y miembros de la familia de MAP cinasas.

Las taupatías están caracterizadas por una hiperfosforilación anómala de tau y son, de acuerdo con Iqbal, K., *et al.* (Biochim. Biophys. Acta 1739 (2005) 198-210):

- La enfermedad de Alzheimer, incluyendo la forma de la enfermedad con solo ovillos
- El síndrome de Down, casos en adultos
- El complejo parkinsonismo-demencia de Guam
- La demencia pugilística
- La enfermedad de Pick
- La demencia con granos argirófilos
- La demencia frontotemporal
- La degeneración corticobasal
- La degeneración palidopontónica
- La parálisis supranuclear progresiva
- La enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker con ovillos.

Hasta ahora, se han encontrado cerca de 40 sitios de fosforilación de serina (S)/treonina (T) en la tau de cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer (Hanger, D.P., *et al.*, J. Biol. Chem. 282 (2007) 23645-23654). El desarrollo de la patología de tau en la enfermedad de Alzheimer está relacionado con su estado de fosforilación. Sin embargo, la mayoría de los 40 sitios de fosforilación no se asocian a la patología de la enfermedad, ya que también se encuentran en la tau extraída de tejido cerebral fetal sano. Solo algunas fosforilaciones son exclusivas de la enfermedad y son presumiblemente responsables de la agregación anómala y la insolubilidad característica que definen a la tau en los PHF del cerebro afectado por la enfermedad de Alzheimer (Morishima-Kawashima, M., *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (1995) 823-829). De acuerdo con Pei, J.J., *et al.* (J. Alzheimer's Disease 14 (2008) 385-392), la literatura existente proporciona información limitada y poco clara sobre cuáles de estos sitios son específicos de cerebros afectados por EA. Pei usó una lista de anticuerpos fosfoespecíficos contra la tau y midió sus niveles en homogeneizados de la corteza temporal medial de 22 pacientes con EA y 10 controles.

Bussiere, T. *et al.* (Acta Neuropathol. 97 (1999) 221-230) describieron que la serina 422 fosforilada (pS422) en proteínas tau es un epítipo patológico que se encuentra en varias enfermedades con degeneración neurofibrilar. Augustinack, J.C., *et al.*, (Acta Neuropathol. 103 (2002) 26-35) describieron la pS422 como correlacionada con la gravedad de la patología neuronal en la enfermedad de Alzheimer. Guillozet-Bongaarts, A., (J. Neurochem. 97 (2006) 1005-1014) describió la fosforilación de tau en la serina 422 como parte del proceso de maduración de los PHF. La tau pS422 también se encuentra en asociación con el desarrollo de patologías en diversos modelos de ratones

transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, Deters, N., *et al.*, mencionaron en *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 400-405 que ratones doblemente transgénicos Dom5/pR5 mostraron que un número 7 veces mayor de neuronas del hipocampo que contienen tau fosforilaron específicamente el epítipo patológico S422. Goetz, J., *et al.*, (*Science* 293 (2001) 1491-1495) informaron de la aparición de tau fosforilada en S422 en los cerebros de ratones transgénicos con tau P301L a los que se inyectaron fibrillas Abeta42.

El documento EP 2 009 104 se refiere a epítipos de la proteína tau que se producen en un estado fosforilado en la proteína tau de los PHF de la enfermedad de Alzheimer y al uso de dichos epítipos para la generación de anticuerpos que detectan específicamente la proteína tau de la enfermedad de Alzheimer. El documento WO 2002/062851 y el documento US 7.446.180 se refieren a anticuerpos con una especificidad por una forma truncada de forma anómala de la proteína tau y aspectos diagnósticos y terapéuticos en relación con la enfermedad de Alzheimer y las taupatías relacionadas.

El documento WO 1998/22120 se refiere a un procedimiento para tratar a un paciente con enfermedad de Alzheimer, que comprende la etapa de administrar al paciente un anticuerpo contra el fragmento de tau fosforilada de los aminoácidos aproximadamente 207 a aproximadamente 222, los aminoácidos de aproximadamente 224 a aproximadamente 240 y los aminoácidos aproximadamente 390 a aproximadamente 408. Los estudios en animales donde se usa el fragmento de tau fosforilada 379-408 [P-Ser396.404] para vacunar ratones transgénicos para tau se mencionan en Asuni, A.A., *et al.*, *J. Neuroscience* 27 (2007) 9115-9129. El documento US 2008/0050383 se refiere a procedimientos de tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer u otras taupatías en un sujeto mediante la administración de un fragmento de proteína tau.

Hasegawa, M., *et al.* (*FEBS Lett.* 384 (1996) 25-30) informan de un anticuerpo monoclonal (AP422) específico para la serina 422 fosforilada en la proteína tau asociada a microtúbulos.

En el documento WO 2001/55725 se informa de un anticuerpo que reconoce específicamente la tau y de un anticuerpo que reconoce específicamente la tau fosforilada (181) para su uso en un procedimiento para el diagnóstico *in vivo* de una taupatía y/o para el diagnóstico diferencial *in vivo* de una taupatía frente a una enfermedad que no sea una taupatía.

En el documento WO 2002/027017 se informa de un anticuerpo preparado a partir de un inmunógeno polipeptídico que tiene una serina fosforilada. El documento WO 2002/062851 se refiere a anticuerpos con una especificidad por una forma truncada de forma anómala de la proteína tau y aspectos diagnósticos y terapéuticos en relación con la enfermedad de Alzheimer y las taupatías relacionadas.

En el documento WO 2004/016655 se informa de un anticuerpo específico contra una proteína tau del sistema nervioso central (SNC), en el que el anticuerpo reconoce específicamente una proteína tau del SNC, pero no una proteína tau periférica y en el que el anticuerpo reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos de una parte conectiva entre la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 4 de un gen que codifica una proteína tau y la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 5 de la misma como un epítipo.

Anticuerpos monoclonales contra la tau pS422 se describen, por ejemplo, en el documento EP 1 876 185. Están disponibles comercialmente anticuerpos policlonales contra la tau pS422 (por ejemplo, ProSci Inc. y Biosource International).

En el documento WO 2006/055178, se informa de un procedimiento para inhibir la fosforilación de la proteína tau en Ser202/Thr205, que comprende poner en contacto una muestra que contiene una proteína tau con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a ligandos difusibles derivados de la amiloide β inhibiendo de este modo la fosforilación de la proteína tau en Ser202/Thr205.

En el documento WO 2007/019273 se informa de una preparación de anticuerpos que se une específicamente a la tau fosforilada en Tyr394 y/o Tyr310. Los estudios en animales donde se usa el fragmento de la tau fosforilada 379-408 [P-Ser396.404] para vacunar ratones transgénicos para tau se mencionan en Asuni, A.A. *et al.*, *J. Neuroscience* 27 (2007) 9115-9129.

El documento EP 2 009 104 se refiere a epítipos de la proteína tau que se producen en un estado fosforilado en la proteína tau de los PHF de la enfermedad de Alzheimer y al uso de dichos epítipos para la generación de anticuerpos que detectan específicamente la proteína tau de la enfermedad de Alzheimer.

El documento US 2008/0050383 se refiere a procedimientos de tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer u otras taupatías en un sujeto mediante la administración de un fragmento de proteína tau.

En el documento WO 2010/037135, se informa de un polipéptido o péptido aislado, sintético o recombinante que comprende un primer dominio que comprende, o que consiste en, un ligando para un receptor de la barrera hematoencefálica (BHE) o equivalente y un segundo dominio que comprende, o que consiste en, una enzima o composición que disminuye la velocidad de agregación de un agregado de proteína, inhibe la formación de un

agregado de proteína, o invierte, digiere o disuelve un agregado de proteína. En el documento WO 2010/115843 se informa de un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo, que puede reconocer y unirse a una proteína tau *in vitro* y/o *in vivo*.

5 En el documento WO 2011/026031 se informa de un anticuerpo monoclonal o su fragmento que se une específicamente a oligómeros de tau y no se une a tau soluble o fibrillas de tau, útil para tratar taupatías, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva y degeneración corticobasal. En el documento WO 2011/053565 se informa de un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína tau humana fosforilada en uno o más de Ser(238) y Thr(245).

10 En el documento WO 2012/045882, se informa de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo fosforilado en la proteína tau de mamífero, útil para tratar trastornos neurodegenerativos tales como taupatías, y para tratar o aliviar deficiencias cognitivas. En el documento WO 2012/049570 se informa de un anticuerpo monoclonal humano anti-tau o un fragmento de unión a tau del mismo. En el documento WO 2012/106363 se informa de un procedimiento de prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras taupatías en un sujeto, que comprende administrar anticuerpos a un ser humano que necesita tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer u otra taupatía, teniendo los anticuerpos especificidad por formas anómalas de la proteína tau, no mostrando dicho anticuerpo unión y/o reactividad a una proteína tau normal y administrándose en condiciones y en una cantidad o cantidades eficaces para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer u otra taupatía.

20 En el documento WO 2012/149365 se informa de un anticuerpo que muestra reactividad con tau agregada y sustancialmente ausencia de reactividad con tau no agregada, en el que la tau agregada comprende al menos dos proteínas tau reticuladas entre sí, directamente o bien a través de un conector, en uno o más residuos de cisteína.

25 En el documento WO 2010/142423 se informa de una composición útil en el tratamiento de taupatías, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, que comprende anticuerpo de unión a tau, compuesto modificado con serina fosforilada en una posición específica que se une específicamente a la tau fosforilada específica y su fragmento y vehículo.

30 En el documento EP 1 876 185 A se informa de un anticuerpo que reconoce polipéptidos fosforilados. En el documento WO 2013/151762 se informa de un anticuerpo anti-tau humanizado. En el documento WO 2014/016737 se informa de anticuerpos monoclonales de pollo novedosos contra tau fosforilada humana y usos de los mismos. En el documento WO 2014/016737 se informa de anticuerpos monoclonales de pollo novedosos contra tau fosforilada humana y usos de los mismos. En el documento WO 2012/149365 se informa de anticuerpos selectivos para dímeros de tau patológicos y oligómeros de tau patológicos prefibrilares y sus usos en el tratamiento, diagnóstico y seguimiento de las taupatías.

35 En el documento WO 2015/091656 se informa de anticuerpos anti-tau(pS422) humanizados y sus procedimientos de uso. En el documento WO 2015/101586 se informa de anticuerpos biespecíficos anti-hapteno/anti-receptor de la barrera hematoencefálica, complejos de los mismos y su uso como transportadores en la barrera hematoencefálica.

40 **BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

La invención se define por las reivindicaciones.

45 En el presente documento se divulgan anticuerpos anti-tau(pS422) humana, especialmente anticuerpos anti-tau(pS422) humana humanizados, y procedimientos de uso de los mismos.

50 Los anticuerpos humanizados, como se informa en el presente documento, no estaban disponibles por procedimientos de humanización estándar. Fue necesario introducir mutaciones no estándar en la secuencia de aminoácidos para obtener un anticuerpo humanizado con características de unión y propiedades farmacocinéticas similares a las del anticuerpo de conejo original que comprende dominios variables con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07 y SEQ ID NO: 11. Esto es especialmente importante ya que se pretende que los anticuerpos, como se informa en el presente documento, atraviesen la barrera hematoencefálica humana y sean eficaces dentro del cerebro humano. Por tanto, los criterios aplicados en general para la selección de anticuerpos humanizados no son lo suficientemente rigurosos para aplicarlos directamente en el caso actual.

55 Los anticuerpos, como se informa en el presente documento, muestran una selectividad con respecto a la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422, con respecto a la tau humana natural no fosforilada y el mutante de tau S422A. La tau humana natural no fosforilada y el mutante de tau S422A no se unen en absoluto o se unen con una afinidad menor, respectivamente.

60 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo monoclonal anti-tau(pS422) humana (humanizado) que es una variante humanizada del anticuerpo Mab 086 producido injertando las HVR de Mab 086 en la región estructural y las regiones constantes humanas, en el que residuos de la región estructural de la región variable humana seleccionados están opcionalmente sustituidos como sigue:

65

un residuo seleccionado de una región estructural de la región variable humana se sustituye por un aminoácido de la región estructural equivalente del anticuerpo Mab 086 de conejo cuando el aminoácido (1) se une de forma no covalente al antígeno directamente, (2) es contiguo a una región HVR, (3) interactúa de otro modo con una región HVR, o (4) participa en la interfase VL-VH;

5 o
 un aminoácido de la región estructural humana que es inusual para una inmunoglobulina humana en esa posición se sustituye con un aminoácido de la posición equivalente del anticuerpo donante de conejo o de la posición equivalente de una inmunoglobulina humana más típica.

10 Un aspecto como se informa en el presente documento es un anticuerpo (humanizado) que se une específicamente a la tau(pS422) humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02, en el que el anticuerpo tiene actividad inhibitora contra la citotoxicidad inducida por tau(pS422), y en el que el anticuerpo se une a un fragmento de la proteína tau(pS422) humana, y en el que dicho fragmento comprende los residuos de aminoácidos 416 a 430 de SEQ ID NO: 02, y en el que dicho anticuerpo comprende una región constante humana, en la que el anticuerpo se selecciona de

15 (a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08 como HVR-H1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 como HVR-H2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 como HVR-H3, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 como HVR-L1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 como HVR-L2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 como HVR-L3;

20 o
 (b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08 como HVR-H1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 como HVR-H2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 como HVR-H3, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 como HVR-L1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 como HVR-L2, y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 como HVR-L3;

25 o
 (c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08 como HVR-H1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 como HVR-H2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 como HVR-H3, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71 como HVR-L1, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 como HVR-L2 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 como HVR-L3

30 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,

35 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

40 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana, en el que el anticuerpo comprende

45 en el dominio variable de la cadena pesada, las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y

a) en el dominio variable de la cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 71, 73 y 15, o

50 b) en el dominio variable de la cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 70, 72 y 15, o

55 c) en el dominio variable de la cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 12, 14 y 79,

60 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,

65 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

En un modo de realización, el anticuerpo humanizado como se informa en el presente documento comprende

a) en el dominio variable de la cadena pesada, las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la

cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 71, 73 y 15, o

b) en el dominio variable de la cadena pesada, las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 70, 72 y 15, o

c) en el dominio variable de la cadena pesada, las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la cadena ligera, las HVR de SEQ ID NO: 12, 14 y 74.

Un aspecto preferente es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana, en el que el anticuerpo comprende las HVR de VH35H5 y VL31A1.

En un modo de realización, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende en el dominio variable de la cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 70, 72 y 15. La SEQ ID NO: 70 corresponde a la secuencia de HVR-L1 y tiene en la posición 32 de acuerdo con Kabat el residuo de aminoácido lisina.

En un modo de realización, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

Un aspecto preferente es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana, en el que el anticuerpo comprende las HVR de VH35H5 y VL49G1.

En un modo de realización preferente, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende en el dominio variable de la cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 71, 73 y 15. La SEQ ID NO: 71 corresponde a la secuencia de HVR-L1 y tiene en la posición 32 de acuerdo con Kabat el residuo de aminoácido lisina.

En un modo de realización, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67.

Un aspecto preferente es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana, en el que el anticuerpo comprende las HVR de VH35H5 y VL35F2.

En un modo de realización, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende en el dominio variable de la cadena pesada las HVR de SEQ ID NO: 08, 09 y 10, y en el dominio variable de la cadena ligera las HVR de SEQ ID NO: 12, 14 y 74. La SEQ ID NO: 12 corresponde a la secuencia de HVR-L1 y tiene en la posición 32 de acuerdo con Kabat el residuo de aminoácido lisina.

En un modo de realización, este anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau(pS422) humana comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68.

En un modo de realización, el anticuerpo humanizado como se informa en el presente documento comprende

a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 67, o

b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66, o

En un modo de realización preferente, el anticuerpo humanizado comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66 o 67 o 68.

En un modo de realización, el anticuerpo es para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En un modo de realización, el anticuerpo tiene una función efectora inactiva. En un modo de realización, el anticuerpo no tiene función efectora. En un modo de realización, el anticuerpo es de la subclase IgG1 humana y tiene las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo

i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o

- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 5 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02).
- En un modo de realización, el anticuerpo tiene un valor de CE_{50} para
- 10 a) el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- b) la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 15 c) agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- d) la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- 20 En un modo de realización, el anticuerpo se une específicamente a la tau(pS422) humana (SEQ ID NO: 02) y no se une a la tau humana (SEQ ID NO: 01).
- En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 25 En un modo de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a la tau(pS422) humana y
- i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- 30 ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 μ g/ml, y/o
- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 35 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- 40 vi) tiene un valor de CE_{50} para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- vii) tiene un valor de CE_{50} para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 45 viii) tiene un valor de CE_{50} para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- 50 ix) tiene un valor de CE_{50} para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- En un modo de realización, el anticuerpo es
- 55 a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- 60 c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- 65

ES 2 809 728 T3

f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

5 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

10 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 10,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y

15 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

20 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 05 y SEQ ID NO: 15,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

25 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,

30 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina,

y

35 c) el anticuerpo

i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o

40 iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

45 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o

50 vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o

vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o

55 viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

60 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

65 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

- 5
- i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 10,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y
- iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- 10
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que
- 15
- i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 20
- en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,
- en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina,
- y
- 25
- c) el anticuerpo
- i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o
- 30
- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 35
- iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- 40
- vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 45
- viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- 50
- ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que
- 55
- a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que
- 60
- i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 10,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y
- iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- 65
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

- i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73 y SEQ ID NO: 15,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 5 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,
- 10 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina,
- y
- c) el anticuerpo
- 15 i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o
- 20 iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 25 v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- 30 vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 35 viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- 40 Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que
- 45 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que
- i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 10,
- 50 ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y
- iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que
- 55 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 15,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 60 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,
- 65 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina,

y

c) el anticuerpo

- 5 i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o
- 10 iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 15 v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- 20 vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 25 viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- 30 Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que
- a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que
- 35 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 08, SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 10,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y
- 40 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que
- 45 i) el dominio variable comprende las HVR de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 74,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 50 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,
- 55 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina,
- y
- 60 c) el anticuerpo
- i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o
- 65 iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID

ES 2 809 728 T3

NO: 02), y/o

iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o

vi) tiene un valor de CE_{50} para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o

vii) tiene un valor de CE_{50} para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o

viii) tiene un valor de CE_{50} para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

ix) tiene un valor de CE_{50} para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y

iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

y

c) el anticuerpo

i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 μ g/ml, y/o

iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o

vi) tiene un valor de CE_{50} para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o

vii) tiene un valor de CE_{50} para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o

viii) tiene un valor de CE_{50} para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

5 Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

10 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y

15 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

20 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

25 y

c) el anticuerpo

30 i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o

35 iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

40 v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o

45 vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o

vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o

50 viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

55 Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

60 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y

65 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

ES 2 809 728 T3

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

5 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

10 y

c) el anticuerpo

i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

15 ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o

iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

20 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o

25 v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o

vi) tiene un valor de CE₅₀ para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o

30 vii) tiene un valor de CE₅₀ para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o

viii) tiene un valor de CE₅₀ para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

35 ix) tiene un valor de CE₅₀ para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

40 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que

a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que

45 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,

ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y

50 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,

b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que

55 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78,

ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,

60 y

c) el anticuerpo

i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o

65 ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o

- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 5 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- 10 vi) tiene un valor de CE_{50} para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- vii) tiene un valor de CE_{50} para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 15 viii) tiene un valor de CE_{50} para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- 20 ix) tiene un valor de CE_{50} para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado), caracterizado por que
- 25 a) el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada, en el que
- 30 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76,
- ii) la región constante es una región constante de IgG1 humana, en la que el residuo de lisina C terminal o el dipéptido de glicina-lisina puede estar presente o ausente, y
- 35 iii) la región constante comprende los cambios aminoacídicos L234A, L235A y P329G,
- b) el anticuerpo comprende dos cadenas ligeras de anticuerpo, comprendiendo cada una de ellas un dominio variable de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera, en el que
- 40 i) el dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69,
- ii) la región constante es una región constante de la cadena ligera kappa humana o una región constante de la cadena ligera lambda humana,
- 45 y
- c) el anticuerpo
- i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- 50 ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 μ g/ml, y/o
- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 55 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- v) se une específicamente a la tau humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A, y/o
- 60 vi) tiene un valor de CE_{50} para el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- vii) tiene un valor de CE_{50} para la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 65

ES 2 809 728 T3

viii) tiene un valor de CE_{50} para agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o

5 ix) tiene un valor de CE_{50} para la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.

En un modo de realización preferente de todos los aspectos, el anticuerpo anti-tau(pS422) humana se caracteriza por que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena ligera en la posición 32 un residuo de aminoácido lisina (K) (numeración de acuerdo con Kabat).

10 El anticuerpo anti-tau(pS422) humana se caracteriza por que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 un residuo de valina.

15 El anticuerpo anti-tau(pS422) humana se caracteriza por que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 un residuo de arginina.

Un aspecto preferente, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo biespecífico humanizado que comprende

20 i) un primer sitio de unión seleccionado de

a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 67, o

25 b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66, o

30 c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68,

y

ii) un segundo sitio de unión seleccionado de

35 a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 82 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85, o

40 b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85, o

c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 84 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85.

45 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización, la formulación farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional.

50 En un modo de realización, el agente terapéutico adicional es un agente terapéutico antiamiloides. En un modo de realización, el agente terapéutico antiamiloides es un anticuerpo antisinucleína alfa humana o un anticuerpo anti-Abeta.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso como medicamento.

55 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer prodrómica.

60 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer leve.

65 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en la reducción de la neurodegeneración inducida por tau(pS422).

- Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en el mantenimiento de la cognición y la función.
- 5 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en la ralentización de la velocidad de deterioro cognitivo y funcional.
- Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para su uso en la ralentización de la velocidad de acumulación de ovillos neurofibrilares.
- 10 En un modo de realización de los aspectos previos, el uso es reduciendo la carga de ovillos neurofibrilares mediante depuración de la tau(pS422).
- En un modo de realización de los aspectos previos, el uso es evitando la acumulación de ovillos neurofibrilares.
- 15 En un modo de realización de los aspectos previos, el uso es retirando/depurando ovillos neurofibrilares.
- En un modo de realización, la prevención y/o retirada es promoviendo la depuración intracelular de agregados de tau.
- 20 En un modo de realización de los aspectos previos, el uso es inhibiendo la diseminación de ovillos neurofibrilares. En un modo de realización, la inhibición es evitando la transferencia interneuronal de formas/semillas de tau patológica.
- Aspectos de la presente invención son también procedimientos de tratamiento que comprenden administrar el anticuerpo (humanizado), como se informa en el presente documento, para tratar la enfermedad de Alzheimer, para tratar la enfermedad de Alzheimer prodrómica, para tratar la enfermedad de Alzheimer leve, para reducir la neurodegeneración inducida por tau(pS422), para mantener la cognición y la función, para ralentizar la velocidad de deterioro cognitivo y funcional y/o para ralentizar la velocidad de acumulación de ovillos neurofibrilares.
- 25 En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 30 En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer prodrómica.
- En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer leve.
- 35 En un modo de realización, el medicamento es para reducir la neurodegeneración inducida por tau(pS422).
- En un modo de realización, el medicamento es para mantener la cognición y la función.
- En un modo de realización, el medicamento es para ralentizar la velocidad de deterioro cognitivo y funcional.
- 40 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) como se informa en el presente documento en la reducción de la neurodegeneración inducida por tau(pS422).
- 45 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) como se informa en el presente documento para mantener la cognición y la función.
- Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) como se informa en el presente documento para ralentizar la velocidad de deterioro cognitivo y funcional.
- 50 Los anticuerpos, como se informa en el presente documento, se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- Con los anticuerpos (humanizados), como se informa en el presente documento, se puede efectuar la inhibición/reducción de la progresión de la enfermedad de Alzheimer y la neuropatología.
- 55 Los anticuerpos (humanizados), como se informa en el presente documento, se pueden usar para proteger a un animal frente al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer o incluso para detener la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un animal. En un modo de realización, el animal es un ser humano.
- 60 En un modo de realización, el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento se une a la tau(pS422) en secciones de cerebro de ratones transgénicos con tau(pS422) y pacientes con enfermedad de Alzheimer; y/o marcadores tau(pS422) en células transgénicas con tau(pS422).
- 65 Los anticuerpos (humanizados), como se informa en el presente documento, se pueden usar para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos (humanizados), como se informa en el presente documento, se unen específicamente a/reconocen formas pertinentes para la enfermedad en estadio temprano y tardío de la tau(pS422) humana.

5 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso del anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para la prevención de la diseminación de la enfermedad de Alzheimer relacionada con la la tau(pS422) humana.

10 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso del anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para la reducción de la desintegración de la membrana lisosómica.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso del anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para la estabilización de la membrana lisosómica contra la desestabilización y/o desintegración inducida por la tau(pS422) humana.

15 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso del anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento para la prevención de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Los anticuerpos (humanizados) como se informa en el presente documento funcionan mediante la inhibición mediada por anticuerpos de la siembra y diseminación de la tau(pS422) humana entre células.

20 Los anticuerpos (humanizados) como se informa en el presente documento protegen a los lisosomas del daño fibrilar mediante la unión a la tau(pS422) humana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1:** Resultado de un estudio farmacocinético en macaco cangrejero; rombo relleno: VH35H5/VL31A1; cuadrado transparente: VH35H5/VL35F2; cuadrado relleno: VH76A6/VL35G4; triángulo relleno: VH32/VL22; círculo relleno: VH00/VL00; eje de abscisas: tiempo después de la dosificación [h]; eje de ordenadas: concentración sérica, norm. por la dosis [($\mu\text{g/ml}$)/(mg/kg)].

Figura 2: Ampliación al intervalo de tiempo 0-200 h de la figura 1.

35 **Figura 3:** Unión bioquímica de diferentes combinaciones de VH y VL humanizados a (A) péptido de tau fosforilada, (B) tau humana de longitud completa fosforilada, (C) péptido de tau no fosforilada, (D) tau humana de longitud completa no fosforilada; (1) = VH00/VL00, (2) = VH32/VL21, (3) = VH20/VL22, (4) = VH32/VL22, (5) = VH33/VL22; concentraciones de recubrimiento: péptido de tau fosforilada: 50 ng/ml, todas las demás dianas: 1 $\mu\text{g/ml}$; (se obtienen resultados similares si el péptido de tau fosforilada se recubre con 1 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados)).

40 **Figura 4:** Unión bioquímica de diferentes combinaciones de VH y VL humanizados a (A) = mutante S422A de tau humana de longitud completa, (B) = tau(pS422) humana agregada; (1) = VH00/VL00, (2) = VH32/VL21, (3) = VH20/VL22, (4) = VH32/VL22, (5) = VH33/VL22; concentraciones de recubrimiento: péptido de tau fosforilada: 50 ng/ml, todas las demás dianas: 1 $\mu\text{g/ml}$; (se obtienen resultados similares si el péptido de tau fosforilada se recubre con 1 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados)).

45 **Figura 5:** Inmunoelctrotransferencia que muestra la selectividad de combinaciones de VH/VL humanizados seleccionadas; (1) = VH00/VL00, (2) = VH32/VL21, (3) = VH20/VL22, (4) = VH32/VL22, (5) = VH33/VL22.

Figura 6: Unión a tau hiperfosforilada en extractos de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer; (1) = VH00/VL00, (2) = VH32/VL21, (3) = VH32/VL22.

55 **Figura 7:** Cuantificación de los niveles de tau(pS442) en extractos de cerebro de ratón; máx-mín, mediana y media (+); la significación se calculó usando la prueba de la *t* de Student, **p* <0,05, ***p* <0,01, ****p* <0,001.

60 A: eje de abscisas: tau(pS422) [ng/mg cerebro]; eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 15 mg/kg.

65 B: eje de abscisas: tau(pS422) [ng/mg cerebro]; eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 15 mg/kg.

15 mg/kg.

Figura 8: Cuantificación de tau total en extractos de cerebro de ratón; máx-mín, mediana y media (+).

5 A: eje de abscisas: tau total [ng/mg cerebro]; eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) a 15 mg/kg.

10 B: eje de abscisas: tau total [ng/mg cerebro]; eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 15 mg/kg.

15 **Figura 9:** Análisis cuantitativo de IHC de la patología de tau(pS422) en ratones TauPS2APP tratados con anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1); máx-mín, mediana y media (+), la significación se calculó mediante la prueba de la *t* de Student, **p <0,01, ***p <0,001.

20 A: corteza; eje de abscisas: ocupación del área [%] por tau(pS422); eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31 A1) a 15 mg/kg.

25 B: hipocampo; eje de abscisas: ocupación del área [%]; eje de ordenadas: 1: valor de referencia, 2: vehículo, 3: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 1,7 mg/kg, 4: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 5 mg/kg, 5: anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) a 15 mg/kg.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- 30 SEQ ID NO: 01 isoforma F de la proteína tau humana (441 residuos)
- SEQ ID NO: 02 isoforma F de la proteína tau humana (441 residuos) fosforilada en el residuo de serina en la posición 422
- 35 SEQ ID NO: 03 fragmento de la proteína tau humana (residuos 416 a 430 de SEQ ID NO: 01) con serina fosforilada en la posición 7 (correspondiente a la posición 422 de SEQ ID NO: 01): Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp
- 40 SEQ ID NO: 04 CDRL1 de anticuerpo de conejo 086 - QSSQSVRTNKLA
- SEQ ID NO: 05 CDRL2 de anticuerpo de conejo 086 - SASTLDF
- SEQ ID NO: 06 CDRL3 de anticuerpo de conejo 086 - LGYFDCSIADCVA
- 45 SEQ ID NO: 07 VL00 de anticuerpo de conejo 086
- SEQ ID NO: 08 CDRH1 de anticuerpo de conejo 086 - SNAIN
- 50 SEQ ID NO: 09 CDRH2 de anticuerpo de conejo 086 - YIAVSGNTYASWAKG
- SEQ ID NO: 10 CDRH3 de anticuerpo de conejo 086 - SNI
- SEQ ID NO: 11 VH00 de anticuerpo de conejo 086
- 55 SEQ ID NO: 12 variante 1 de CDRL1 humanizada - RSSQSVRTNKLA
- SEQ ID NO: 13 variante 2 de CDRL1 humanizada - RSSQSVRTNRLA
- 60 SEQ ID NO: 14 variante 1 de CDRL2 humanizada - SASTLDY
- SEQ ID NO: 15 variante 1 de CDRL3 humanizada - LGYFDSSADIVA
- SEQ ID NO: 16 variante 1 de VL humanizado - VL21
- 65 SEQ ID NO: 17 variante 2 de VL humanizado - VL22

ES 2 809 728 T3

| | | |
|----|---------------|--|
| | SEQ ID NO: 18 | CDRH2 humanizada - YIAVSGNTYYADSVKG |
| 5 | SEQ ID NO: 19 | variante 1 de VH humanizado - VH32 |
| | SEQ ID NO: 20 | variante 2 de VH humanizado - VH20 |
| | SEQ ID NO: 21 | variante 3 de VH humanizado - VH33 |
| 10 | SEQ ID NO: 22 | variante 2 de CDRL2 humanizada - SASTLQS |
| | SEQ ID NO: 23 | variante 3 de CDRL2 humanizada - SASTLES |
| 15 | SEQ ID NO: 24 | variante 2 de CDRL3 humanizada - LGYFDSSIADSV |
| | SEQ ID NO: 25 | variante 3 de CDRL3 humanizada - LGYFDSSIADRVA |
| | SEQ ID NO: 26 | variante 4 de CDRL3 humanizada - LGYFDPSIADPVA |
| 20 | SEQ ID NO: 27 | variante 5 de CDRL3 humanizada - LGYFDSSIADIVA |
| | SEQ ID NO: 28 | variante 6 de CDRL3 humanizada - LGYFDPSADPIA |
| 25 | SEQ ID NO: 29 | variante 7 de CDRL3 humanizada - LGYFDPSADPVA |
| | SEQ ID NO: 30 | variante 3 de CDRL1 humanizada - RASQGVRTNKLA |
| | SEQ ID NO: 31 | variante 4 de CDRL1 humanizada - RASQSVRTNKLA |
| 30 | SEQ ID NO: 32 | variante 4 de VL humanizado - VL01 |
| | SEQ ID NO: 33 | variante 5 de VL humanizado - VL09 |
| | SEQ ID NO: 34 | variante 6 de VL humanizado - VL12 |
| 35 | SEQ ID NO: 35 | variante 7 de VL humanizado - VL15 |
| | SEQ ID NO: 36 | variante 8 de VL humanizado - VL16 |
| 40 | SEQ ID NO: 37 | variante 9 de VL humanizado - VL17 |
| | SEQ ID NO: 38 | variante 10 de VL humanizado - VL19 |
| 45 | SEQ ID NO: 39 | variante 11 de VL humanizado - VL28 |
| | SEQ ID NO: 40 | variante 12 de VL humanizado - VL33 |
| | SEQ ID NO: 41 | variante 13 de VL humanizado - VL35 |
| 50 | SEQ ID NO: 42 | variante 14 de VL humanizado - VL39 |
| | SEQ ID NO: 43 | variante 15 de VL humanizado - VL40 |
| 55 | SEQ ID NO: 44 | variante 16 de VL humanizado - VL41 |
| | SEQ ID NO: 45 | variante 17 de VL humanizado - VL42 |
| | SEQ ID NO: 46 | variante 4 de VH humanizado - VH01 |
| 60 | SEQ ID NO: 47 | variante 5 de VH humanizado - VH02 |
| | SEQ ID NO: 48 | variante 6 de VH humanizado - VH03 |
| 65 | SEQ ID NO: 49 | variante 7 de VH humanizado - VH04 |
| | SEQ ID NO: 50 | variante 8 de VH humanizado - VH14 |

ES 2 809 728 T3

| | | |
|----|---------------|--|
| | SEQ ID NO: 51 | variante 9 de VH humanizado - VH15 |
| 5 | SEQ ID NO: 52 | variante 10 de VH humanizado - VH18 |
| | SEQ ID NO: 53 | variante 11 de VH humanizado - VH19 |
| | SEQ ID NO: 54 | variante 12 de VH humanizado - VH22 |
| 10 | SEQ ID NO: 55 | variante 13 de VH humanizado - VH23 |
| | SEQ ID NO: 56 | variante 14 de VH humanizado - VH24 |
| | SEQ ID NO: 57 | variante 15 de VH humanizado - VH31 |
| 15 | SEQ ID NO: 65 | variante 16 de VH humanizado - VH35H5 |
| | SEQ ID NO: 66 | variante 18 de VL humanizado - VL31A1 |
| 20 | SEQ ID NO: 67 | variante 19 de VL humanizado - VL49G1 |
| | SEQ ID NO: 68 | variante 20 de VL humanizado - VL35F2 |
| | SEQ ID NO: 69 | variante 21 de VL humanizado - VL53A2 |
| 25 | SEQ ID NO: 70 | variante 5 de CDRL1 humanizada |
| | SEQ ID NO: 71 | variante 6 de CDRL1 humanizada |
| 30 | SEQ ID NO: 72 | variante 4 de CDRL2 humanizada |
| | SEQ ID NO: 73 | variante 5 de CDRL2 humanizada |
| | SEQ ID NO: 74 | variante 8 de CDRL3 humanizada |
| 35 | SEQ ID NO: 75 | variante 9 de CDRL3 humanizada |
| | SEQ ID NO: 76 | variante 17 de VH humanizado - VH76A6 |
| 40 | SEQ ID NO: 77 | variante 1 de CDRH1 humanizada |
| | SEQ ID NO: 78 | variante 22 de VL humanizado - VL35G4 |
| | SEQ ID NO: 79 | variante 10 de CDRL3 humanizada |
| 45 | SEQ ID NO: 80 | variante 23 de VL humanizado - VL145B12 |
| | SEQ ID NO: 81 | variante 6 de CDRL2 humanizada |
| 50 | SEQ ID NO: 82 | cadena pesada 1 del anticuerpo anti-receptor de transferrina |
| | SEQ ID NO: 83 | cadena pesada 2 del anticuerpo anti-receptor de transferrina |
| | SEQ ID NO: 84 | cadena pesada 3 del anticuerpo anti-receptor de transferrina |
| 55 | SEQ ID NO: 85 | cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de transferrina |
| | SEQ ID NO: 86 | variante 24 de VL humanizado - VL4G1 |
| 60 | SEQ ID NO: 87 | variante 11 de CDRL3 humanizada |

Tabla de correspondencia de secuencias:

| dominio variable | CDR1 | CDR2 | CDR3 | secuencia completa |
|------------------|------|------|------|--------------------|
| VL00 | 04 | 05 | 06 | 07 |

| dominio variable | CDR1 | CDR2 | CDR3 | secuencia completa |
|------------------|------|------|------|--------------------|
| VL01 | 04 | 05 | 06 | 32 |
| VL4G1 | 12 | 05 | 87 | 86 |
| VL09 | 31 | 23 | 06 | 33 |
| VL12 | 30 | 22 | 06 | 34 |
| VL15 | 30 | 22 | 24 | 35 |
| VL16 | 30 | 22 | 25 | 36 |
| VL17 | 12 | 05 | 06 | 37 |
| VL19 | 12 | 05 | 06 | 38 |
| VL21 | 12 | 05 | 15 | 16 |
| VL22 | 13 | 14 | 15 | 17 |
| VL28 | 13 | 05 | 29 | 39 |
| VL31A1 | 70 | 72 | 15 | 66 |
| VL33 | 13 | 05 | 27 | 40 |
| VL35 | 13 | 05 | 27 | 41 |
| VL35F2 | 12 | 14 | 74 | 68 |
| VL35G4 | 12 | 14 | 79 | 78 |
| VL39 | 13 | 05 | 26 | 42 |
| VL40 | 13 | 05 | 29 | 43 |
| VL41 | 13 | 05 | 28 | 44 |
| VL42 | 13 | 05 | 28 | 45 |
| VL49G1 | 71 | 73 | 15 | 67 |
| VL53A2 | 12 | 14 | 75 | 69 |
| VL145B12 | 71 | 81 | 15 | 80 |
| VH00 | 08 | 09 | 10 | 11 |
| VH01 | 08 | 09 | 10 | 46 |
| VH02 | 08 | 09 | 10 | 47 |
| VH03 | 08 | 09 | 10 | 48 |
| VH04 | 08 | 09 | 10 | 49 |
| VH14 | 08 | 09 | 10 | 50 |
| VH15 | 08 | 09 | 10 | 51 |
| VH18 | 08 | 18 | 10 | 52 |
| VH19 | 08 | 18 | 10 | 53 |
| VH20 | 08 | 18 | 10 | 20 |
| VH22 | 08 | 18 | 10 | 54 |
| VH23 | 08 | 18 | 10 | 55 |
| VH24 | 08 | 18 | 10 | 56 |
| VH31 | 08 | 09 | 10 | 57 |
| VH32 | 08 | 09 | 10 | 19 |
| VH33 | 08 | 09 | 10 | 21 |
| VH35H5 | 8 | 9 | 10 | 65 |
| VH76A6 | 8 | 77 | 10 | 76 |

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

- 5 La presente invención se define por las reivindicaciones y se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional del mismo, en particular a un anticuerpo, en particular a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, en particular a un péptido o anticuerpo de unión, que el péptido o anticuerpo de unión reconoce y se une específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, en particular en la proteína tau humana o en un fragmento de la misma, en particular a un confórmero patológico de proteína tau, pero, en un modo de realización, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en los que dicho péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en un mamífero, en particular en la proteína tau humana como se muestra en SEQ ID NO: 02, que
- 10

consiste en los residuos de aminoácidos de tau 416-430 que comprenden una Ser fosforilada en la posición 422 (pS422).

I. DEFINICIONES

5 Una "región estructural humana aceptadora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región
10 estructural humana aceptadora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptadora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia
15 de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que
20 refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

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

30 Los términos "anticuerpo anti-tau(pS422) humana" y "un anticuerpo que se une específicamente a la tau(pS422) humana" se refieren a un anticuerpo que se puede unir a la tau(pS422) humana con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse a la tau(pS422) humana. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana a una proteína distinta de tau(pS422) humana no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a la tau(pS422) humana
35 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoanálisis (RIA).

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

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas
45 de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un 50 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un 80 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un 90 % o más. En un modo de realización, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un 95 % o más. En un modo de realización preferente, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia tiene interacciones de unión con los mismos residuos que el anticuerpo de referencia en el antígeno.
55

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

65 La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir

adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

5 Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, un receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

10 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

15 El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Fys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

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

30 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento. El término "anticuerpo de longitud completa" indica un polipéptido multimérico que consiste en dos polipéptidos de la cadena ligera del anticuerpo y dos polipéptidos de la cadena pesada del anticuerpo unidos por enlaces disulfuro, en el que el residuo de lisina C terminal (K) puede estar presente o no en los dos polipéptidos de la cadena pesada del anticuerpo.

40 Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

45 Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos aminoácidos que se producen lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

55 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoácidos de HVR no humanas y residuos aminoácidos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

60 El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3).

Las HVR en el presente documento incluyen

- 5 (a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);
- 10 (b) las CDR que se producen en los residuos aminoacídicos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);
- 15 (c) los contactos con antígeno que se producen en los residuos aminoacídicos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y
- (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los residuos aminoacídicos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

20 Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-tau(pS422) humana" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen por disulfuros. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su

dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derecho de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

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

El término "tau(pS422) humana", como se usa en el presente documento, se refiere a tau(pS422) humana natural (UniProt P37840). El término engloba la tau(pS422) humana no procesada "de longitud completa", así como cualquier forma de tau(pS422) humana que resulte del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes naturales de la tau(pS422) humana, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de la tau(pS422) humana se muestra en SEQ ID NO: 02.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo

que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS

A. Ejemplos de anticuerpos anti-tau(pS422) humana humanizados

Los anticuerpos humanizados, como se informa en el presente documento, no estaban disponibles por procedimientos de humanización estándar. Se requirió introducir mutaciones no estándar en la secuencia de aminoácidos para obtener un anticuerpo humanizado con características de unión y propiedades farmacocinéticas similares a las del anticuerpo de conejo original. Esto es especialmente importante ya que se pretende que los anticuerpos, como se informa en el presente documento, atraviesen la barrera hematoencefálica humana y sean eficaces dentro del cerebro humano. Por tanto, los criterios aplicados en general para la selección de anticuerpos humanizados no fueron lo suficientemente rigurosos para aplicarlos directamente en el caso actual.

Se ha encontrado que, para obtener un anticuerpo humanizado adecuado y desarrollable, se tuvo que reemplazar dos cisteínas que formaban un puente disulfuro en la CDRL3 (CDR3 de la cadena ligera) por serina e isoleucina, respectivamente. Además de garantizar la orientación apropiada de la misma CDRL3, se eliminó un residuo de isoleucina presente en el medio de la CDRL3 de conejo, dando como resultado una CDRL3 humanizada que es un residuo de aminoácido más pequeño que la CDRL3 de conejo original.

También se ha descubierto que para mantener las propiedades farmacocinéticas *in vivo* el residuo de aminoácido en la posición 32 en la cadena ligera debería ser una lisina (numeración de acuerdo con Kabat). La eliminación del puente disulfuro en la HVR-L3 de la cadena ligera no tiene un impacto en el comportamiento cinético *in vivo*.

Se ha descubierto además que es ventajoso mantener tres residuos de aminoácido de valina en la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat). Sin estar vinculados por esta teoría, se supone que estos residuos se requieren para garantizar la presentación apropiada de los bucles de unión a antígeno de la región variable de la cadena pesada. Adicionalmente, es ventajosa la presencia de un residuo de arginina en la posición 71 en el dominio variable de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat).

La HVR-L3 comprende dos residuos de ácido aspártico que podrían ser un punto de desamidación, especialmente durante el almacenamiento prolongado. En la variante de dominio variable de la cadena ligera VL35G4, se ha cambiado uno de estos dos residuos de ácido aspártico.

Toda la numeración como se usa en el presente documento se basa en el esquema de numeración de los dominios variables de Kabat.

En la siguiente tabla se muestran las características de las diferentes variantes humanizadas del dominio variable de la cadena ligera de conejo en combinación con los dominios variables de la cadena pesada humanizada VH14 y VH20, respectivamente. El compañero de unión era la tau(pS422) humana.

| VH14 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|--------|---------------|--------|
| VL00 | | 1,04E-03 | | 11 | 25 |
| VL01 | | 3,82E-03 | | 3 | 25 |
| VL09 | | 2,35E-03 | | 5 | 25 |
| VL12 | | 2,48E-03 | | 5 | 25 |
| VL15 | | 3,63E-03 | | 3 | 25 |
| VL16 | | n.d. | | | |
| VL17 | | 2,39E-03 | | 5 | 25 |

ES 2 809 728 T3

| VH14 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|--------|---------------|--------|
| VL17 | | 3,03E-03 | | 4 | 25 |
| VL19 | | 1,98E-03 | | 6 | 25 |
| VL21 | | 2,93E-03 | | 4 | 25 |
| VL22 | | 3,30E-03 | | 4 | 25 |
| YL28 | | 3,84E-03 | | 3 | 25 |
| VL33 | | 1,02E-02 | | 1 | 25 |
| VL35 | | 1,10E-02 | | 1 | 25 |
| VL39 | | 5,22E-03 | | 2 | 25 |
| VL40 | | 3,01E-03 | | 4 | 25 |
| VL41 | | n.d. | | | |
| VL42 | | n.d. | | | |

| VH20 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|----------|---------------|--------|
| VL00 | | n.d. | | | |
| VL01 | | n.d. | | | |
| VL09 | | 2,14E-03 | | 5 | 25 |
| VL12 | | n.d. | | | |
| VL15 | | n.d. | | | |
| VL16 | | n.d. | | | |
| VL17 | | 5,35E-04 | | 22 | 25 |
| VL19 | | 3,66E-04 | | 32 | 25 |
| VL19 | 1,94E+04 | 1,13E-03 | 5,84E-8 | 10,2 | 37 |
| VL21 | | 7,88E-04 | | 15 | 25 |
| VL21 | 3,03E+04 | 2,10E-03 | 6,95E-08 | 5,5 | 37 |
| VL22 | | 8,39E-04 | | 14 | 25 |
| VL22 | 3,44E+04 | 2,37E-03 | 6,90E-08 | 4,9 | 37 |
| VL28 | | 1,27E-03 | | 9 | 25 |
| VL28 | 2,50E+04 | 3,61E-03 | 1,45E-07 | 3,2 | 37 |
| VL33 | | 1,61E-03 | | 7 | 25 |
| VL35 | | 1,59E-03 | | 7 | 25 |
| VL39 | | 1,91E-03 | | 6 | 25 |
| VL40 | | 9,98E-04 | | 12 | 25 |
| VL41 | | 4,29E-03 | | 3 | 25 |
| VL42 | | 4,57E-03 | | 3 | 25 |

Valores de referencia VH00 con VL00 (anticuerpo de conejo):

- 5 25 °C: kd = 2,6E-04; t/2 = 44 min.
- 37 °C: ka = 3,7E+04, kd = 5,25E-03, KD = 1,4E-08, t/2 = 22 min.

10 En la siguiente tabla se muestran las características de las diferentes variantes humanizadas del dominio variable de la cadena ligera de conejo en combinación con los dominios variables de la cadena ligera humanizada VL17 y VL19, respectivamente.

| VL17 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|--------|---------------|--------|
| VH00 | | 4,98E-04 | | 23 | 25 |
| VH01 | | 2,3E-03 | | 5 | 25 |
| VH02 | | 3,71E-03 | | 3 | 25 |
| VH03 | | 3,93E-03 | | 3 | 25 |
| VH04 | | 4,16E-03 | | 3 | 25 |

ES 2 809 728 T3

| VL17 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|--------|---------------|--------|
| VH14 | | 3,0E-03 | | 4 | 25 |
| VH15 | | 3,26E-03 | | 4 | 25 |
| VH18 | | 2,3E-03 | | 5 | 25 |
| VH19 | | n.d. | | | |
| VH20 | | 5,4E-04 | | 22 | 25 |
| VH22 | | 2,0E-03 | | 6 | 25 |
| VH23 | | 7,0E-04 | | 17 | 25 |
| VH24 | | 7,9E-04 | | 15 | 25 |
| VH31 | | n.d. | | | |
| VH32 | | n.d. | | | |
| VH33 | | n.d. | | | |

| VL19 con | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M] | t/2 dis [min] | T [°C] |
|----------|-----------|----------|----------|---------------|--------|
| VH00 | | n.d. | | | |
| VH01 | | 1,9E-03 | | 6 | 25 |
| VH02 | | n.d. | | | |
| VH03 | | n.d. | | | |
| VH04 | | n.d. | | | |
| VH14 | | 2,0E-03 | | 6 | 25 |
| VH15 | | n.d. | | | |
| VH18 | | 1,9E-03 | | 6 | 25 |
| VH19 | | 2,0E-03 | | 6 | 25 |
| VH20 | | 3,7E-04 | | 32 | 25 |
| VH20 | 1,94E+04 | 1,13E-03 | 5,84E-08 | 10,2 | 37 |
| VH22 | | 2,1E-03 | | 6 | 25 |
| VH23 | | 5,7E-04 | | 20 | 25 |
| VH24 | | 6,3E-04 | | 18 | 25 |
| VH31 | | n.d. | | | |
| VH32 | | n.d. | | | |
| VH33 | | n.d. | | | |

Valores de referencia VH00 con VL00 (anticuerpo de conejo):

- 5 25 °C: kd = 2,6E-04; t/2 = 44 min.
 37 °C: ka = 3,7E+04, kd = 5,25E-03, KD = 1,4E-08, t/2 = 22 min.

10 En la siguiente tabla se muestran las constantes cinéticas para diferentes combinaciones de VH/VL (determinadas de acuerdo con el ejemplo 8).

| Combinación de VH/VL | KD 25 °C [nM] | t/2 dis 25 °C [min] | MR | KD 37 °C [nM] | t/2 dis 37 °C [min] | MR |
|----------------------|---------------|---------------------|-----|---------------|---------------------|-----|
| VH00/VL00 | 8 | 54 | 0,6 | 12 | 24 | 0,8 |
| VH20/VL22 | 37 | 16 | 0,4 | 68 | 5 | 0,5 |
| VH32/VL21 | 18 | 26 | 0,5 | 32 | 9 | 0,6 |
| VH32/VL22 | 14 | 29 | 0,5 | 31 | 8 | 0,6 |
| VH33/VL22 | 20 | 25 | 0,4 | 39 | 8 | 0,5 |

La unión bioquímica de diferentes combinaciones de VH y VL humanizados se muestra en las figuras 3 y 4.

15 En la siguiente tabla se muestra la especificidad de unión para diferentes combinaciones de VH/VL (valores de CE50 en [ng/ml]).

| Combinación de VH/VL | Fragmento de tau(pS422) SEQ ID NO: 03 | tau(pS422) de longitud completa SEQ ID NO: 02 | agregados de la tau(pS422) | tau de longitud completa SEQ ID NO: 01 | péptido de tau de residuos 416 a 430 de SEQ ID NO: 01 | tau asociada a microtúbulos | mutante de tau S422A SEQ ID NO: 01 |
|----------------------|--|--|----------------------------|---|--|-----------------------------|---------------------------------------|
| VH00/VL00 | 6,3 | 5,2 | 18,1 | sin unión | > 1000 | sin unión | 47,9 |
| VH20/VL22 | 4,8 | 4,0 | 27,2 | sin unión | > 1000 | sin unión | 110,6 |
| VH32/VL21 | 4,4 | 2,9 | 9,4 | sin unión | 634 | sin unión | 21,5 |
| VH32/VL22 | 5,6 | 3,5 | 8,3 | sin unión | 48 | sin unión | 17,4 |
| VH33/VL22 | 5,6 | 3,8 | 13,5 | sin unión | 120 | sin unión | 34,5 |

La sensibilidad de las combinaciones de VH/VL humanizados seleccionadas con mutante de la tau humana S422A se puede observar a partir de las inmunoelectrotransferencias que se muestran en la figura 5. Todas las variantes humanizadas se unen selectivamente a la tau humana fosforilada en S422. Existe un nivel bajo de reactividad cruzada con los epítomos fosforilados distintos de S422 del anticuerpo de conejo original, pero las variantes humanizadas que se muestran presentan menos reactividad cruzada a este respecto que el anticuerpo de conejo original.

En la figura 6 se muestra la unión a PHF-tau en extractos de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer para el anticuerpo de conejo original y para anticuerpos anti-tau(pS422) humana humanizados seleccionados.

En base a lo anterior, la combinación de VH32/VL22 se eligió como anticuerpo humanizado.

Se han encontrado las siguientes tasas de depuración promedio en macaco cangrejero con la combinación VH/VL original y la combinación VH/VL humanizada (la depuración normal para la IgG humana es 0,18-0,36 ml/h/kg).

| Combinación de VH/VL | depuración promedio a 1 mg/kg [ml/h/kg] | depuración promedio a 10 mg/kg [ml/h/kg] |
|----------------------|---|--|
| VH00/VL00 | 0,15 | n.d. |
| VH32/VL22 | 1,03 | 2,5 |

n.d. = no determinado

Se puede observar que la combinación VH32/VL22 tiene una tasa de depuración incrementada que depende de la dosis.

En la siguiente tabla, se muestran las constantes cinéticas para otras combinaciones de VH/VL generadas para abordar la tasa de depuración incrementada, dependiente de la dosis, de VH32/VL22 con el fragmento de tau(pS422) (determinada de acuerdo con el ejemplo 10).

| Combinación de VH/VL | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] |
|----------------------|-----------|----------|---------|
| VH35H5/VL31A1 | 3,80E+05 | 6,16E-04 | 1,62 nM |
| VH35H5/VL35F2 | 1,40E+05 | 3,21E-04 | 2,29 nM |
| VH35H5/VL49G1 | 3,12E+05 | 6,24E-04 | 2,00 nM |
| VH76A6/VL145B12 | 2,40E+05 | 6,28E-04 | 2,61 nM |
| VH00/VL00 | 1,35E+05 | 2,65E-04 | 1,96 nM |
| VH32/VL35G4 | 1,03E+05 | 2,31E-04 | 2,25 nM |
| VH76A6/VL35G4 | 1,12E+05 | 8,65E-05 | 0,77 nM |

En la siguiente tabla se muestran las constantes cinéticas para combinaciones de VH/VL como fragmento Fab con el fragmento de tau(pS422) y tau(pS422) de longitud completa (determinado de acuerdo con el ejemplo 11 y el ejemplo 12).

| Combinación de VH/VL | Fragmento de tau(pS422) | | | tau(pS422) de longitud completa | | |
|----------------------|-------------------------|----------|---------|---------------------------------|----------|---------|
| | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] |
| VH32/VL22 | 4,79E+05 | 2,76E-04 | 0,6 | 8,42E+05 | 4,23E-04 | 0,5 |
| VH35H5/VL31A1 | 4,10E+05 | 1,43E-04 | 0,3 | 6,68E+05 | 2,26E-04 | 0,3 |

| Combinación de VH/VL | Fragmento de tau(pS422) | | | tau(pS422) de longitud completa | | |
|----------------------|-------------------------|----------|---------|---------------------------------|----------|---------|
| | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [nM] |
| VH35H5/VL49G1 | 4,23E+05 | 6,03E-05 | 0,1 | 7,46E+05 | 9,38E-05 | 0,1 |

En la siguiente tabla se muestra la especificidad de unión para diferentes combinaciones de VH/VL determinadas por ELISA (selectividad para tau fosforilada frente a no fosforilada).

| Combinación de VH/VL | tau(pS422) de longitud completa SEQ ID NO: 02 CE50 [ng/ml] | fragmento de tau(pS422) SEQ ID NO: 03 CE50 [ng/ml] | agregados de la tau(pS422) CE50 [ng/ml] | tau de longitud completa SEQ ID NO: 01 DO a 1 µg/ml | péptido de tau 416 a 430 de SEQ ID NO: 01 DO a 1 µg/ml |
|----------------------|--|--|---|---|--|
| VH00/VL00 | 26,2 | 40,0 | 62,9 | 0,04 | 0,54 |
| VH32/VL22 | 21,9 | 40,4 | 31,1 | 0,14 | 2,26 |
| VH35H5/VL31A1 | 21,1 | 33,0 | 36,6 | 0,04 | 1,03 |
| VH35H5/VL35F2 | 28,0 | 45,2 | 57,0 | 0,04 | 1,31 |
| VH35H5/VL49G1 | 20,4 | 34,0 | 30,6 | 0,04 | 1,42 |
| VH32/VL4G1 | 16,8 | 27,3 | 27,0 | 0,04 | 1,13 |
| VH76A6/VL145B12 | 23,8 | 40,3 | 39,0 | 0,04 | 0,44 |
| VH32/VL35G4 | 26,1 | 43,8 | 78,6 | 0,04 | 0,07 |
| VH76A6/VL35G4 | 23,3 | 33,4 | 79,6 | 0,04 | 0,07 |

- 5 Se han encontrado las siguientes tasas de depuración promedio en macaco cangrejero con diferentes combinaciones de VH/VL (la depuración normal para la IgG humana es 0,18-0,36 ml/h/kg; n.d. = no determinado).

| Combinación de VH/VL | depuración promedio a 1 mg/kg [ml/h/kg] | depuración promedio a 10 mg/kg [ml/h/kg] | depuración promedio a 25 mg/kg [ml/h/kg] |
|----------------------|---|--|--|
| VH00/VL00 | 0,15 | n.d. | n.d. |
| VH32/VL22 | 1,03 | 2,5 | n.d. |
| VH35H5/VL31A1 | 0,14 | 0,19 | 0,24 |
| VH35H5/VL35F2 | 0,62 | n.d. | n.d. |
| VH35H5/VL49G1 | 0,63 | n.d. | n.d. |
| VH76A6/VL35G4 | 0,10 | n.d. | n.d. |

- 10 Se han encontrado las siguientes tasas de depuración promedio en ratón con diferentes combinaciones de VH/VL (la depuración normal para la IgG humana es 0,18-0,36 ml/h/kg).

| Combinación de VH/VL | depuración promedio a 5 mg/kg [ml/h/kg] | depuración promedio a 25 mg/kg [ml/h/kg] | depuración promedio a 50 mg/kg [ml/h/kg] |
|----------------------|---|--|--|
| VH00/VL00 | 0,17 | 0,21 | n.d. |
| VH32/VL22 | 0,27 | n.d. | 1,31 |
| VH35H5/VL31A1 | 0,20 | 0,29 | n.d. |
| VH35H5/VL35F2 | 0,18 | 0,30 | n.d. |
| VH35H5/VL49G1 | 0,28 | 0,58 | n.d. |
| VH76A6/VL35G4 | 0,19 | 0,52 | n.d. |

- 15 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo anti-tau(pS422) humana humanizado tiene una tasa de depuración promedio después de la aplicación intravenosa de menos de 0,6 ml/h/kg a una dosis de hasta 25 mg/kg. En un modo de realización, la tasa de depuración promedio es de 0,3 ml/h/kg o menos a una dosis de hasta 25 mg/kg.

- 20 En un aspecto preferente, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina, y en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la
- 25

cadena pesada en la posición 71 (número de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

En un aspecto preferente, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina, y en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

En un aspecto preferente, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina, y en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

La invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y que comprende además tres secuencias de HVR en VL seleccionadas de

i) (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; o

ii) (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15,

en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina, y en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.

En otro modo de realización, el VH o VL contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-tau(pS422) humana que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse a la tau(pS422) humana.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-tau(pS422) humana de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal humanizado. En un modo de realización, un anticuerpo anti-tau(pS422) humana es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase de anticuerpo o isotipo como se define en el presente documento.

El anticuerpo (humanizado), como se informa en el presente documento, reduce los niveles de tau(pS422) en el cerebro de ratones transgénicos TauPS2APP.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-tau(pS422) humana (humanizado) de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describen en las secciones 1-7 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (KD) de ≤ 100 nM, ≤ 50 nM, o entre 1 nM y 100 nM (por ejemplo, 10^{-7} M o menos, por ejemplo, de 10^{-7} M a 10^{-9} M).

En un modo de realización, Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de realización, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ¹²⁵I en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando a continuación el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos

MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) con carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (n.º 269620 de Nunc), se mezcla ¹²⁵I-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta L.G. *et al.*, Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización, K_d se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIAcore®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIAcore®-2000 o un BIAcore®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un modo de realización, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas a la mitad de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con el tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20®; PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación (k_{as}) y las tasas de disociación (k_{dis}) usando un modelo simple de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIAcore®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Si la velocidad de asociación supera 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, como se mide en un espectrómetro tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para un análisis de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para un análisis de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994), págs. 269-315; véanse también los documentos WO 93/16185; US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopos de unión al receptor de rescate y que tienen un incremento en la semivida *in vivo* véase el documento US 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un dominio único es un anticuerpo de un dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos humanizados

Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, reteniendo mientras la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos

humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana de longitud completa. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V., *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describen el injerto en la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn, J. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68; y Klimka, A. *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por la tau(pS422) humana y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes de la tau(pS422) humana. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, el documento WO 93/08829 y Traunecker, A., *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), y la genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, el documento US 4.676.980 y Brennan, M. *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

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

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a la tau(pS422) humana, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

5. Variantes de anticuerpos

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos

dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

5 **a) Variantes de sustitución, inserción y delección**

En determinados modos de realización se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Se proporcionan cambios más sustanciales en la siguiente tabla bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de la cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

15

TABLA

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

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

20

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

25

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

30

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

35

En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham, B.C. y Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se enlaza en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células principales para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); el documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-

1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103 (2004) 2738-2743). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones de la depuración/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B., *et al.*, *Int. Immunol.* 18 (2006: 1759-1769).

5 Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de la región Fc incluyen mutantes de la región Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el denominado mutante de la región Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

10 Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida al FcR (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604).

15 En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, disminuidas), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E. *et al.*, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184.

20 En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L., *et al.*, *J. Immunol.* 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K., *et al.*, *J. Immunol.* 24 (1994) 2429-2434). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de la región Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

25 Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., *Nature* 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

30 d) Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína

En determinados modos de realización puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen por residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoc conjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados modos de realización se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

40 e) Derivados de anticuerpos

45 En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxi etilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la elaboración debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

60 En otro modo de realización se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteínico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

65

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Los anticuerpos se pueden producir usando composiciones y procedimientos recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-tau(pS422) humana descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora por Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de su expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos y levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar para determinar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, alphaLISA, inmunoelectrotransferencia, matriz de anticuerpos o de fase inversa, etc.

En un ensayo ELISA o alphaLISA ejemplar, se une tau(pS422) en solución (por ejemplo, en sobrenadantes celulares, lisados de células o tejidos, líquidos corporales, etc.) mediante un anticuerpo de captura, que se une específicamente a un primer epítipo en tau(pS422), o tau(pS422) en una determinada conformación y un anticuerpo de detección acoplado a una entidad de detección, que se une específicamente a un segundo epítipo o conformación de tau(pS422). La lectura se basa en la entidad de detección (quimioluminiscencia, fluorescencia, luminiscencia inducida por transferencia de energía, etc.). En algunos casos, el mismo anticuerpo se puede usar en el mismo ensayo como anticuerpo de captura y como anticuerpo de detección para detectar formas agregadas de tau(pS422) (véase, por ejemplo, Tokuda, T. *et al.*, *Neurology* 75 (2010) 1766-1772).

En el caso de la matriz de anticuerpos, se colocan los anticuerpos sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Se bloquean los portaobjetos y se incuban con una solución que contiene tau(pS422), se lavan para retirar los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluorescencia. Se mide la señal de fluorescencia con un escáner de portaobjetos para detección de fluorescencia. De forma similar, para una matriz de fase inversa se colocan tau(pS422) recombinante, sobrenadante celular, lisados de células o tejidos, líquidos corporales, etc., sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Se bloquean los portaobjetos y se incuban las matrices individuales con un anticuerpo contra un epítipo específico en tau(pS422). Se retiran mediante lavado los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondiente marcado con fluorescencia. Se mide la señal de fluorescencia mediante un escáner de portaobjetos para detección de fluorescencia (Dernick, G., *et al.*, *J. Lipid Res.* 52 (2011) 2323-2331).

En el ejemplo de inmunoelectrotransferencia, se separa por peso molecular la tau(pS422) recombinante agregada o tau(pS422) derivada, por ejemplo, de sobrenadante celular, lisados de células o tejidos, líquidos corporales, etc. en SDS PAGE o condiciones de gel natural y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Después del bloqueo, se incuba la membrana con anticuerpos específicos contra una secuencia de aminoácidos o conformaciones de tau(pS422). Después de esto, se lava la membrana para retirar el anticuerpo no unido. Se detectan los anticuerpos unidos mediante anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a entidades de detección para quimioluminiscencia o fluorescencia u otros medios de detección. Se unirán anticuerpos específicos contra las secuencias de aminoácidos de tau(pS422) a la tau(pS422) en diversas formas agregadas y, de ahí, pesos moleculares, siempre que la agregación no enmascare el epítipo. Por otra parte, los anticuerpos específicos de conformación detectarán solo determinadas formas agregadas de la tau(pS422) que revelarán solo bandas a pesos moleculares específicos (véase, por ejemplo, Towbin, H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4353; Burnette, W.N., *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195-203).

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competencia para identificar un anticuerpo que compita con el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento en cuanto a su unión a la tau(pS422) humana. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une mediante el anticuerpo (humanizado) como se informa en el presente documento. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para mapear un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris, G.E. (ed.), *Epitope Mapping Protocols*, en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Humana Press, Totowa, NJ (1996).

En un ensayo de competencia ejemplar, se incuba tau(pS422) humana inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a la tau(pS422) humana y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por su unión a la tau(pS422) humana. Como control, se incuba tau(pS422) humana inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de su incubación, en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a la tau(pS422) humana, se retira el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcador asociado con la tau(pS422) humana inmovilizada. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado con la tau(pS422) humana inmovilizada en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces, eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por su unión a la tau(pS422) humana (véase, por ejemplo, Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988)).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-tau(pS422) humana de los mismos que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, protección frente a/reducción de/inhibición de la citotoxicidad inducida por tau(pS422), y/o protección frente a/reducción de/inhibición de la transmisión entre células de la tau(pS422) humana oligomérica, y/o reducción de la actividad caspasa inducida por tau(pS422) en células LUHMES. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica.

La actividad biológica protectora se puede evaluar añadiendo medio acondicionado que contenga tau(pS422) segregada, lo que provoca la muerte celular en las células neuronales receptoras. Esta toxicidad se puede invertir añadiendo anticuerpos protectores como se describe en el presente documento. La naturaleza tóxica de la tau(pS422) segregada se ha establecido previamente (Emmanouilidou, E., *et al.*, J. Neurosci., 30 (2010) 6838-6851).

D. Procedimientos y composiciones para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de la tau(pS422) humana en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido cerebral.

En un modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de la tau(pS422) humana en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-tau(pS422) humana como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-tau(pS422) humana a la tau(pS422) humana, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-tau(pS422) humana y la tau(pS422) humana. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización se usa un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para seleccionar sujetos idóneos para su tratamiento con un anticuerpo anti-tau(pS422) humana, por ejemplo, cuando la tau(pS422) humana es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro de tipo 1 (NACH1), fallo autonómico puro, síndrome de Down, complejo de Guam y varios trastornos por cuerpos de Lewy, tal como enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (EDCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (vCLEA), determinadas formas de enfermedad de Gaucher y la demencia de la enfermedad de Parkinson (DEP).

En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos anti-tau(pS422) humana marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodensos, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

E. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio;

complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen, además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, cuando la indicación que se está tratando es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Alzheimer prodrómica, la formulación farmacéutica también puede contener uno o más ingredientes activos adicionales tales como donepezilo, memantina, rivastigmina, galantamina, rivastigmina, mesilatos ergoloides, un antibiótico anti-Abeta y un anticuerpo anti-alfa-sinucleína.

F. Procedimientos y composiciones terapéuticas

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-tau(pS422) humana. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en la inhibición de la citotoxicidad inducida por tau(pS422) en neuronas humanas y neuroglíocitos, o la inhibición de la transmisión célula a célula de la tau(pS422) humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o la reducción de la actividad de caspasa inducida por la tau(pS422). En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-tau(pS422) humana para su uso en un procedimiento de inhibición de la citotoxicidad inducida por tau(pS422) en neuronas humanas y neuroglíocitos, o inhibición de la transmisión célula a célula de la tau(pS422) humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o reducción de la actividad de caspasa inducida por la tau(pS422) en un individuo, que comprende administrar al individuo una eficaz del anticuerpo anti-tau(pS422) humana para inhibir la citotoxicidad inducida por tau(pS422) en neuronas y neuroglíocitos humanos, o inhibir la transmisión célula a célula de la tau(pS422) humana oligomérica entre neuronas y neuroglíocitos, o reducir la actividad de caspasa inducida por la tau(pS422). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano.

Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento y un vehículo

farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-tau(pS422) humana proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

5 Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar un anticuerpo de la invención con al menos un agente terapéutico adicional.

10 Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-tau(pS422) humana y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

15 Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos, administración con inyección intravenosa rápida e infusión intermitente.

20 Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consecuente con las buenas prácticas médicas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos de cabecera. No es necesario, pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

35 Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

50 Por ejemplo, cuando la indicación que se está tratando es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Alzheimer prodrómica, el agente terapéutico adicional se puede seleccionar de donepezilo, memantina, rivastigmina, galantamina, rivastigmina, mesilatos ergoloides, un antibiótico anti-Abeta y un anticuerpo anti-alfa-sinucleína.

60 Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana.

65 III. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el

tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-tau(pS422) humana.

IV. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Materiales y procedimientos

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes y oligonucleótidos

Se prepararon los segmentos de genes deseados mediante síntesis química en Geneart GmbH (Regensburg, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron por secuenciación de ADN. De forma alternativa, fragmentos cortos de ADN sintético se ensamblaron por hibridación de oligonucleótidos sintetizados químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos fueron preparados en metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

Reactivos

Todos los productos químicos comerciales, anticuerpos y kits se usaron como se proporcionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, si no se indica de otro modo.

Ejemplo 1

Preparación y purificación de anticuerpos de conejo

Inmunización

Se usaron conejos New Zealand White (NZW) de Charles River Laboratories International, Inc. para la inmunización. Se disolvió el fosfopéptido tau (416-430)[pS422] acoplado en hemocianina de lapa californiana (KLH) en tampón de K₃PO₄ pH 7,0 a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló (1:1) con adyuvante de Freund completo (CFA) hasta la generación de una emulsión estable. Tres conejos recibieron una inyección intradérmica (i.d.) de 2 ml de emulsión seguida de una segunda inyección intramuscular (i.m.) y una tercera subcutánea (s.c.), cada una de 1 ml, en un intervalo de una semana. La cuarta inyección i.m. de 1 ml se llevó a cabo dos semanas después, seguida de dos inyecciones s.c. adicionales de 1 ml en un intervalo de cuatro semanas. Se recogieron muestras de sangre periférica de 10 ml de cada animal 4-6 días después de la tercera, cuarta, quinta y sexta inyección y se usaron para la separación de células individuales en FACS. Se recogieron 0,5 ml adicionales de suero de cada animal al mismo tiempo y se usaron para la determinación de la respuesta de anticuerpos específicos contra tau (416-463)[pS422].

Formación de anticuerpos

La respuesta de anticuerpos a la inmunización se determinó por dilución seriada de sueros usando un ELISA, en el que se incubaron 30 ng por pocillo de tau (416-430)[pS422] biotinilada en PBS 1x a 4 °C durante la noche en placas de microvaloración de 96 pocillos recubiertas previamente con estreptavidina (MC1347, Micro Coat Biotechnologie GmbH, Bernried, Alemania). Para la detección, se usó anticuerpo anti-IgG de conejo caprino unido a una peroxidasa de rábano picante (The Jackson laboratory) a una dilución 1:16000. Se usó sustrato BM Blue POD, que precipita tetrametilbencidina (TMB), una solución lista para su uso de Roche Diagnostics GmbH para la visualización. Se detuvo la reacción por medio de HCl 1 N y se midió en Tecan Infinite por 450/690 nm.

Clonación de linfocitos B

Recubrimiento de placas

Se incubaron placas estériles de 6 pocillos recubiertas con estreptavidina (grado de cultivo celular) con una mezcla de 3 péptidos de control biotinilados (tau (416-430) no fosforilada, MCAK_Humana (88-102)[95-pSer] y MAP2_Humana (1802-1816)[pSer-1802]) o con el péptido tau (416-430)[pS422] fosforilado biotinilado cada uno en una concentración a 0,5-1 µg/ml en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron placas en PBS estéril tres veces antes del uso. Se recubrieron placas de 6 pocillos de cultivo celular con 2 µg/ml de KLH (hemocianina de lapa californiana) en tampón de carbonato (bicarbonato de sodio 0,1 M, hidrogenocarbonato de disodio 34 mM, pH 9,55) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas en PBS estéril tres veces antes del uso.

Aislamiento de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) de conejo

Se diluyó dos veces EDTA que contenía sangre completa con PBS 1x antes de la centrifugación por densidad en Lympholyte Mammal (Cedarlane Laboratories) que se realizó para aislar PBMC de conejo. Se lavaron los PBMC dos veces antes de teñirlos con anticuerpos.

Medio EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con FCS al 10 % (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y beta-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia)

Reducción de macrófagos/monocitos

Se usaron placas de 6 pocillos estériles (calidad para el cultivo de células) para reducir los macrófagos y monocitos a través de adhesión inespecífica. Se recubrieron pocillos bien con KLH (hemocianina de lapa californiana) o con estreptavidina y los péptidos de control. Se llenó cada pocillo como máximo con 4 ml de medio y hasta 6 x 10⁶ linfocitos monomorfonucleares en la sangre periférica del conejo inmunizado y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la estufa de incubación. Se usaron el 50 % de las células del sobrenadante para la etapa de adsorción; el 50 % de células restantes se sometieron directamente a tinción con inmunofluorescencia y separación de células individuales.

Adsorción de linfocitos B sobre péptidos

Se sembraron placas de histocultivo de 6 pocillos recubiertas con estreptavidina y el péptido biotinilado tau (416-430)[pS422] con hasta 6 x 10⁶ células por 4 ml de medio y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la estufa de incubación. Se retiraron las células no adherentes mediante lavado cuidadoso de los pocillos 1-2 veces con PBS 1x. Las células adherentes que quedaron se separaron con tripsina durante 10 minutos a 37 °C en la estufa de incubación y a continuación se lavaron dos veces en medio. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción con inmunofluorescencia.

Tinción inmunofluorescente y separación de células individuales

El anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con FITC usado para la separación de células individuales fue de AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Alemania). Para la tinción de la superficie, se incubaron las células de la etapa de disminución y adsorción con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con FITC en PBS durante 30 min de rodamiento en la cámara frigorífica a 4 °C en la oscuridad. Después de la centrifugación, se retiraron los sobrenadantes por aspiración. Se sometieron los PBMC a 2 ciclos de centrifugación y lavado con PBS enfriada con hielo. Finalmente, los PBMC se resuspendieron en PBS enfriada con hielo y se sometieron inmediatamente al análisis por FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis por FACS para discriminar entre las células muertas y vivas. La FACS se realizó usando un Becton Dickinson FACSAria equipado con el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) y se depositaron células vivas individuales marcadas con FITC en placas de 96 pocillos.

Cultivo de linfocitos B

Se prepararon cultivos de linfocitos B mediante un procedimiento similar al descrito por Zubler, R.H. *et al.*, J. Immunol. 134 (1985) 3662-3668. En resumen, se cultivaron linfocitos B separados individuales en placas de 96 pocillos con 210 µl/pocillo de medio EL-4 B5 con Pansorbin Cells (1:20000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % y células de timoma murino EL-4-B5 irradiadas con radiación gamma (2 × 10⁴/pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en la estufa de incubación. Se retiraron los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B para cribado y se reogieron las células de inmediato para la clonación o congelación del gen de la región variable a 80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

10 Cribado de clones de linfocitos B

Se cribaron sobrenadantes de cultivo de linfocitos B para la unión a la tau (416-430)[pS422] biotinilada por ELISA. Se usaron tau (416-430) no fosforilada, KLH (hemocianina de lapa californiana) y el péptido fosforilado no relacionado MCAK_Humana (88-102)[95-pSer] como antígenos de control. Para la preparación de placas de ELISA, se incubaron placas de microvaloración recubiertas previamente con estreptavidina con tau (415-430)[pS422] biotinilada a 50 ng/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. El recubrimiento con KLH o péptidos de control se realizó a 1 µg/ml. Se diluyeron los sobrenadantes de linfocitos B 1:5 a 1:10 y se incubaron en las placas de microvaloración recubiertas con antígeno durante 60 min. Después del lavado intensivo, se detectó la unión de los anticuerpos de conejo usando un anticuerpo de detección anti-IgG de conejo ovino conjugado con digoxigenina (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 370 nm-492 nm. Los clones de linfocitos B que proporcionan señales por encima del fondo con tau (416-430)[pS422] biotinilada pero no con KLH y MCAK_Humana (88-102)[95-pSer] se consideraron adicionalmente y se sometieron a clonación génica de la región variable.

25 Amplificación por PCR de dominios V y secuenciación

Se preparó ARN total usando el kit NucleoSpin® 8/96 RNA (Macherey & Nagel; 740709,4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todas las etapas se realizaron en un sistema de tratamiento de líquidos epMotion 5075 (Eppendorf). Se eluyó el ARN con 60 µl de agua sin RNasa. Se usaron 6 µl de ARN para generar ADNc mediante reacción de retrotranscriptasa usando el Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) y oligo dT-primer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina (VH y VL) con el AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl usando los cebadores rbHCfinal.up y rbHCfinal.do para la cadena pesada y rbLCfinal.up y rbLCfinal.do para la cadena ligera (véase la tabla a continuación). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: inicio en caliente a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 70 °C, 45 s a 68 °C, y una extensión final a 68 °C durante 7 min.

Tabla:

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| rbHCfinal.up (SEQ ID NO: 61) | AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC |
| rbHCfinal.do (SEQ ID NO: 62) | CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG |
| rbLCfinal.up (SEQ ID NO: 63) | AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC |
| rbLCfinal.do (SEQ ID NO: 64) | CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC |

Se cargaron 8 µl de 50 µl de solución de PCR en un 48 E-Gel al 2 % (Invitrogen G8008-02). Se limpiaron las reacciones de PCR positivas usando el kit NucleoSpin® Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. Se secuenciaron directamente 12 µl de productos de PCR purificados en ambas direcciones usando rbHCfinal.up y rbHCfinal.do para las cadenas pesadas y rbLCfinal.up y rbLCfinal.do para las cadenas ligeras (véase la tabla anterior).

Expresión recombinante de anticuerpos monoclonales de conejo y anticuerpos quiméricos de conejo/ratón

Para la expresión recombinante de anticuerpos monoclonales de conejo, se clonaron productos de PCR que codifican VH o VL como ADNc en vectores de expresión mediante el procedimiento de clonación de extremos cohesivos (Haun, R.S. *et al.*, BioTechniques 13 (1992) 515-518; Li, M.Z., *et al.*, Nature Methods 4 (2007) 251-256). Los plásmidos de expresión linealizados que codifican la región constante kappa o gamma de conejo e insertos de VL se amplificaron por PCR usando cebadores superpuestos. Se incubaron productos de PCR purificados con ADN-polimerasa T4 que generaba extremos monocatenarios cohesivos. Se detuvo la reacción mediante la adición de dCTP. En la siguiente etapa, se combinaron el plásmido y el inserto y se incubaron con RecA, lo que indujo la recombinación específica del sitio. Los plásmidos recombinados se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, se recogieron las colonias cultivadas

y se sometieron a prueba para determinar el plásmido recombinado correcto mediante preparación del plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN. Para la expresión de anticuerpos, se cotransfectaron transitoriamente los plásmidos de HC y LC aislados en células HEK293 y se recogieron los sobrenadantes después de 1 semana. Para la clonación y expresión de anticuerpos quiméricos de ratón y conejo, se amplificaron las regiones VH y VL por PCR y se subclonaron en vectores de expresión que contenían la región constante kappa de ratón o constante gamma 1 de ratón. Los plásmidos de HC y LC quiméricos de conejo/ratón se aislaron, se sometieron a prueba mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN para una inserción correcta y se transfectaron transitoriamente en células HEK293. Se recogieron los sobrenadantes una semana después de la transfección.

10 Purificación de anticuerpos

Se purificaron anticuerpos de conejo expresados recombinantemente a partir de sobrenadantes de cultivo celular en columnas MabSelectSuRe™ (GE Healthcare). Antes de cargar la muestra, se equilibró la columna con 25 mmol/l de Tris-HCl, 25 mmol/l de NaCl, pH 7,4. Se logró la elución del anticuerpo con 50 mmol/l de acetato pH 3,14. Se cargó inmediatamente la muestra eluida en una columna de desalación (Sephadex G25, GE Healthcare) y se eluyó en 20 mmol/l de His-HCl, 140 mmol/l de NaCl pH 6,0. Se usó también este tampón para el almacenamiento del anticuerpo purificado. La temperatura general de almacenamiento fue de 4 °C, temperatura ambiente durante el procedimiento de purificación y -80 °C después de la alicuotación. Se purificaron los anticuerpos de quimeras de conejo/ratón expresados recombinantemente a partir de sobrenadantes de cultivo celular en columnas MabSelectSuRe™ (GE Healthcare). Antes de cargar la muestra, se equilibró la columna con PBS 1x, pH 7,4. Se logró la elución de los anticuerpos con 100 mmol/l de citrato pH 3,0. Se neutralizó inmediatamente la muestra eluida con 2 mol/l de Tris/HCl pH 9,0. Posteriormente, se cargaron los anticuerpos en una columna de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) y se eluyeron en 20 mmol/l de His-HCl, 140 mmol/l de NaCl pH 6,0. Se usó también este tampón para el almacenamiento de los anticuerpos purificados. La temperatura general de almacenamiento fue de 4 °C, temperatura ambiente durante el procedimiento de purificación y -80 °C después de la alicuotación.

Ejemplo 2

30 **Los anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 son altamente selectivos para la tau fosforilada en pS422 y se unen a agregados fibrilares de tau pS422**

ELISA

Se expresaron recombinantemente anticuerpos monoclonales de conejo en células HEK 293. Se sometieron a prueba sobrenadantes del cultivo celular o anticuerpos de conejo purificados para determinar la unión a la tau (416-430)[pS422] biotinilada, la tau (416-430) no fosforilada, KLH y el fosfopéptido no relacionado MCAK_Humana (88-102)[95-pSer] por ELISA. Para la preparación de placas de ELISA, se incubaron placas de microvaloración recubiertas previamente con estreptavidina con tau (415-430)[pS422] biotinilada a 50 ng/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. El recubrimiento con KLH o péptidos de control se realizó a 1 µg/ml. Se incubaron anticuerpos anti-tau pS422 de conejo (Abcam AB51071) o sobrenadantes que contenían anticuerpos de conejo en las placas de microvaloración marcadas con antígeno durante 60 min a diversas concentraciones. Después del lavado intensivo, se detectó la unión de los anticuerpos de conejo usando un anticuerpo de detección anti-IgG de conejo ovino conjugado con digoxigenina (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 370 nm - 492 nm. La unión del anticuerpo se caracterizó por sus valores de CE50. La unión del anticuerpo a la tau (416-430)[pS422] biotinilada y péptidos de tau (416-430) no fosforilada se caracterizó por sus valores de CE50. Se estimó la reactividad cruzada con el péptido fosforilado de KLH o MCAK por medición de un solo punto a altas concentraciones, es decir, a una dilución 1:5 de los sobrenadantes de cultivo celular. Los resultados se muestran en la tabla a continuación. Se descubrió que los valores de CE50 de unión al péptido fosforilado de tau eran más de 100 veces menores que los valores de CE50 de unión al péptido de tau, lo que indica una selectividad de al menos 100 veces para el fragmento de tau fosforilada en comparación con el péptido de tau no fosforilada. La unión al péptido fosforilado de control de KLH y MCAK estaba al nivel del fondo con todos los anticuerpos, que es aproximadamente 1<3 % de las medidas de valor máximo con péptido fosforilado de tau.

Tabla:

| | CE ₅₀ de péptido de tau fosforilada (µg/ml) | CE ₅₀ de péptido de tau no fosforilada (µg/ml) | Valor de IgG del sobrenadante (µg/ml) | DO de dilución 1:5 de sobrenadante | |
|---------|--|---|---------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| | | | | KLH (mE) | MCAK (mE) |
| Mab 005 | < 0,003 | 3,727 | 5,818 | 0,026 | 0,067 |
| Mab 019 | < 0,003 | 1,076 | 6,958 | 0,026 | 0,023 |
| Mab 020 | 0,002 | >3,369 | 3,369 | 0,016 | 0,010 |
| Mab 085 | 0,0009 | 0,146 | 6,46 | 0,029 | 0,062 |

| | CE ₅₀ de péptido de tau fosforilada (µg/ml) | CE ₅₀ de péptido de tau no fosforilada (µg/ml) | Valor de IgG del sobrenadante (µg/ml) | DO de dilución 1:5 de sobrenadante | |
|---------|--|---|---------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| | | | | KLH (mE) | MCAK (mE) |
| Mab 086 | 0,0011 | 0,266 | 8,84 | 0,046 | 0,104 |
| Mab 097 | 0,0013 | 1,281 | 19,87 | 0,042 | 0,029 |

5 También se sometió a prueba la especificidad para tau pS422 de longitud completa soluble y agregado. Se recubrió con agregados fibrilares de tau pS422 (300 µg/ml) una placa de microvaloración Maxisorb (Nunc) basada en poliestireno durante la noche a temperatura ambiente (t.a.). De forma similar, se recubrió la placa de microvaloración Maxisorb con tau de longitud completa y tau pS422 solubles. Se añadieron anticuerpos de conejo anti-tau pS422 (Abcam AB51071) o anticuerpos de conejo purificados y se incubaron durante 60 min en concentraciones de hasta 1000 ng/ml. Después del lavado intensivo, se detectó la unión de los anticuerpos de conejo usando un anticuerpo de detección anti-IgG de conejo ovino conjugado con digoxigenina (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 370 nm - 492 nm. La unión del anticuerpo se caracterizó por sus valores de CE50. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla:

| Mab de conejo | CE ₅₀ de la proteína tau pS422 (µg/ml) | CE ₅₀ de proteína tau (µg/ml) | CE ₅₀ de tau pS422 fibrilar (µg/ml) |
|---------------|---|--|--|
| Mab 005 | 0,00034 | sin unión | 0,00755 |
| Mab 019 | 0,00038 | sin unión | 0,00059 |
| Mab 020 | 0,00036 | sin unión | 0,00042 |
| Mab 085 | 0,00025 | sin unión | 0,00074 |
| Mab 086 | 0,00023 | sin unión | 0,00048 |
| Mab 097 | 0,00040 | sin unión | 0,01358 |

15 Anticuerpos monoclonales de conejo unidos a la proteína tau-pS422 con valores de CE50 inferiores a 1 ng/ml. Se detectó tau pS422 fibrilar con valores de CE50 que varían de 0,4 ng/ml a 14 ng/ml. Las señales de unión a la proteína tau de longitud completa no fosforilada no se distinguían de los niveles de fondo. Por lo tanto, se estimó que cada uno de los anticuerpos se une a la tau pS422 y la tau pS422 fibrilar con una selectividad de al menos 100 veces en comparación con tau.

BIAcore™

25 Se investigó adicionalmente la unión a agregados de la tau pS422 fibrilar y se confirmó mediante análisis BIAcore™. Se realizaron las mediciones con el instrumento BIAcore 3000 a 37 °C. El sistema y el tampón de muestra fue HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Polisorbato 20 al 0,005 % (v/v)). Se sometió un chip sensor BIAcore™ CM5 a un procedimiento de preacondicionamiento. Se inyectaron secuencialmente SDS al 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H₃PO₄ 100 mM durante 30 s sobre las cubetas de lectura FC1, FC2, FC3 y FC4. El procedimiento de acoplamiento de amina se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el asistente BIAcore 3000™ v. 4.1. Después de una activación con EDC/NHS de la superficie del sensor, se inmovilizó un anticuerpo mAb anti-tau no fosfoselectivo <TAU> M-4/53-IgG en las cubetas de lectura del sensor FC2, FC3 y FC4. Como control, se capturó un anticuerpo contra CK-MM (isotipo de creatina cinasa), que reconoce un antígeno no pertinente, en la cubeta de lectura FC1. Se diluyeron el mAb <TAU>M-4/53-IgG y el anticuerpo contra CK-MM a 30 µg/ml en NaAc 10 mM pH 5,0 y se inyectaron a 10 µl/min durante 7 min de tiempo de contacto para inmovilizar 10.000 UR del sistema de captura de anticuerpos. Se desactivó la superficie por saturación con etanolamina 1 M. Se acondicionó el sensor mediante 5 ciclos con proteína tau filamentosa fosforilada (solución madre de 0,3 mg/ml diluida 1:100 en HBS-EP) como analito en solución a 10 µl/min durante 2 min. Se realizó la regeneración con glicina 10 mM pH 2,5 a 30 µl/min durante 3 min. Se suponía que la unión del analito al mAb 4/53 no disocia los filamentos de ptau, porque no se pudo observar una disociación de los filamentos de ptau del mAb 4/53. Para todos los otros ciclos de medición, se diluyeron 1:100 0,3 mg/ml de filamentos de ptau en tampón de HBS-EP y se inyectaron a 10 µl/min durante 1 min para presentar la ptau a los respectivos analitos de anticuerpo en un modo sándwich heterogéneo. Se diluyeron los analitos de anticuerpo en tampón de HBS-EP a una concentración de 100 nM y se inyectaron en el sistema a 20 µl/min durante 3 min. Después de 3 min de disociación, se regeneró la superficie del sensor mediante 2 inyecciones de glicina 10 mM pH 2,5 durante 1 min a 100 µl/min, seguido de un lavado con HBS durante 15 s a 100 µl/min. Se controlaron la fase de asociación y disociación de las interacciones. Dado que el analito de anticuerpo en solución es bivalente, la cinética del anticuerpo-ptau cargado de avidéz se caracterizó por un modelo de disociación bifásica, que consiste en una etapa de disociación temprana rápida basada en afinidad seguida de una etapa cinética estabilizada por avidéz, pero limitante de la velocidad en la disociación compleja última. 10 s (temprana) y 50 s (tardía) después del final de la

inyección de analito, se cuantificaron la k_d y $t/2$ (dis), cuando fue posible. Se evaluaron las mediciones cinéticas usando un procedimiento de doble referencia. En primer lugar, se sustrajo la señal de la referencia FC1 para corregir el efecto de tampón de la solución madre y la unión inespecífica. En segundo lugar, se sustrajo la inyección de analito 0 nM para corregir la disociación de los anticuerpos primarios del sistema de captura respectivo. Se evaluaron las tasas cinéticas usando un modelo de ajuste de la disociación de Langmuir 1.1 de acuerdo con el programa informático de evaluación BIAcore™ v.4.1. Se calculó el semitiempo de estabilidad del complejo antígeno/anticuerpo (min) de acuerdo con la fórmula $\ln(2)/60 \cdot k_d$.

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

Tabla:

| Clon | temprana (10 s) | | tardía (50 s) | |
|---------|-----------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | k_d (1/s) | t/2 dis (min) | k_d (1/s) | t/2 dis (min) |
| Mab 005 | 2,19E-03 | 5,3 | $3,12 \times 10^{-3}$ | 4 |
| Mab 019 | 1,43E-02 | 0,8 | $6,17 \times 10^{-4}$ | 19 |
| Mab 020 | 3,28E-03 | 3,5 | $4,08 \times 10^{-4}$ | 28 |
| Mab 085 | n.d. | n.d. | $6,60 \times 10^{-4}$ | 18 |
| Mab 086 | 1,62E-03 | 7,2 | $3,68 \times 10^{-4}$ | 32 |
| Mab 097 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

Ejemplo 3

Unión de anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 a ptau intracelular en secciones de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer

La detección inmunohistoquímica específica y sensible de una patología por ptau en tejido cerebral afectado por la enfermedad de Alzheimer mediante anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 se investigó mediante experimentos de tinción de inmunofluorescencia usando criosecciones de tejido cerebral humano de pacientes con EA. Se detectaron IgG de conejo mediante anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo caprinos conjugados con Alexa Fluor488® (Invitrogen/Molecular Probes A11034). La tinción específica y sensible de los depósitos y filamentos de ptau era evidente para los clones Mab 005, Mab 019, Mab 020, Mab 085, Mab 086 y Mab 097. Eran apreciables depósitos intracelulares de ptau, como grandes ovillos neurofibrilares e hilos alargados de neutrófilos. Se determinó una concentración mínima eficaz que varía entre 0,08 y 0,016 $\mu\text{g/ml}$ para todos los clones investigados, lo que indica una unión altamente sensible a depósitos genuinos de ptau humana genuina.

Ejemplo 4

Humanización de anticuerpos anti-tau(pS422) de conejo

El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)), como se usa en el presente documento, indica cada una del par de dominios de la cadena ligera y pesada que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno tau(pS422). Los dominios variables de la cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR), cuyas secuencias están muy conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables".

Se analizaron las estructuras del dominio VH y VL del anticuerpo de conejo mAb 086 por ordenador y se compararon con una base de datos estructural de dominios VH y VL humanos (IMGT). Se eligió un panel de dominios V estructuralmente más similares para injertar las CDR del anticuerpo de conejo en los dominios VH y VL humanos elegidos. Además, se tuvieron en cuenta las similitudes en la secuencia primaria para reducir la elección de los dominios V humanos alineando la secuencia primaria del dominio VH y VL del anticuerpo de conejo con el repertorio de dominios V humanos. En algunas variantes de humanización se introdujeron retromutaciones dentro de las regiones estructurales para los residuos originales. De forma similar, se introdujeron mutaciones en las CDR en algunas variantes, cuando fue apropiado para incrementar potencialmente la afinidad por el antígeno, para mantener la estructura terciaria de la CDR y para retirar rasgos característicos no deseados como residuos de cisteína o los residuos que pueden sufrir una modificación después de la purificación del anticuerpo.

Se cotransfectaron los vectores de la cadena pesada y ligera que contienen cada una de las variantes humanizadas en células HEK293 en suspensión en placas de cultivo de microvaloración de forma matricial para obtener cultivos celulares que expresan IgG de tamaño normal de todas las combinaciones posibles de la cadena ligera/pesada. Después de 5 días de cultivo a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes y se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A en la escala de microvaloración.

Ejemplo 5**Generación de vectores de expresión recombinantes**5 a) Generación de vectores para la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulina usando la región constante de la IgG1 humana

10 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena pesada humanizada que comprende la región constante de la IgG1 humana (CH1, bisagra, CH2, CH3) y un dominio VH de anticuerpo anti-tau(pS422) humana humanizado derivado del anticuerpo de conejo Mab 086 fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VH del anticuerpo específico contra tau(pS422) humana con un elemento de secuencia que codifica la región constante de la IgG1 humana.

15 La región constante de la IgG1 humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

15  ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
    YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
    YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
20  LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSV MHEALHNHYT
    QKSLSLSPGK

```

(SEQ ID NO: 58).

25 El vector de expresión también comprendía un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en la dirección 5' a 3':

- 30 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- 35 - un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada (VH),
- un ácido nucleico que codifica una región constante de la IgG1 humana, y
- 40 - la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

b) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina usando la región constante kappa de Ig humana

45 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera kappa humanizada que comprende la región constante kappa de Ig humana (CL-kappa) y un dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-tau(pS422) humana derivado del anticuerpo de conejo Mab 086 fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (kappa) del anticuerpo anti-tau(pS422) humana con un elemento de secuencia que codifica la región constante kappa de Ig humana.

50 La región constante kappa de Ig humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

55  RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE
    KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

```

(SEQ ID NO: 59).

60 El vector de expresión también comprendía un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena ligera kappa del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en la dirección 5' a 3':

- 65 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (5'UTR),

- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- un ácido nucleico que codifica una región constante kappa de Ig humana, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

10 c) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras de inmunoglobulina usando la región constante lambda de Ig humana

15 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera lambda humanizada que comprende la región constante lambda de Ig humana (CL-lambda) y un dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-tau(pS422) humana derivado del anticuerpo de conejo Mab 086 fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (lambda) del anticuerpo anti-tau(pS422) humana con un elemento de secuencia que codifica la región constante lambda de Ig humana.

20 La región constante lambda de Ig humana tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

GQPKAAPSVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGA VTV AWKADSSPVK AGVETTTPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK
SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS

(SEQ ID NO: 60).

25 El vector de expresión también comprendía un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

30 La unidad de transcripción de la cadena ligera lambda del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en la dirección 5' a 3':

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- un ácido nucleico que codifica una región constante lambda de Ig humana, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

45 d) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina usando la región constante kappa de Ig humana

50 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera kappa de Ig humana que comprende la región constante de la Ig-kappa humana (CL-kappa) y un dominio VL (kappa) de anticuerpo anti-tau(S422) humana derivado del anticuerpo de conejo Mab 086 fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (kappa) del anticuerpo anti-tau(pS422) humana con un elemento de secuencia que codifica la región constante kappa de Ig humana. La construcción estaba en una organización genómica, es decir, estaban presentes intrones en el péptido señal y entre los dominios VL (kappa) y CL-kappa.

55 El vector de expresión también comprendía un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción de la cadena ligera kappa del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en la dirección 5' a 3':

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV),
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),

- una región constante kappa de IgG humana, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

5 e) Generación de vectores para la expresión de cadenas ligeras lambda de inmunoglobulina usando la región constante lambda de Ig humana

10 Se ensambló el gen de fusión que codifica la cadena ligera lambda de Ig humana que comprende la región constante lambda de Ig humana (CL-lambda) y un dominio VL (lambda) de anticuerpo anti-tau(S422) humana derivado del anticuerpo de conejo Mab 086 fusionando un fragmento de ADN que codifica el respectivo dominio VL (lambda) del anticuerpo anti-tau(pS422) humana con un elemento de secuencia que codifica la región constante lambda de Ig humana. La construcción estaba en una organización genómica, es decir, había presentes intrones en el péptido señal y entre los dominios VL (lambda) y CL-lambda.

15 El vector de expresión también comprendía un origen de replicación del vector pUC18, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y un gen de la beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

20 La unidad de transcripción de la cadena ligera lambda del anticuerpo comprende los siguientes elementos funcionales en la dirección 5' a 3':

- el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV),
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de la cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera (VL),
- una región constante lambda de IgG humana, y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).

35 **Ejemplo 6**

Producción recombinante de anticuerpos anti-tau(pS422) humana

40 Se produjeron anticuerpos en células HEK293 transfectadas de forma transitoria (derivadas de la línea de células de riñón embrionario humano 293) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección de los vectores respectivos como se describe en el ejemplo 5, se usó el reactivo de transfección "293-Free" (Novagen). Los anticuerpos se expresaron a partir de plásmidos de expresión individuales. Las transfecciones se realizaron como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Se recogieron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos recombinantes tres a siete días después de la transfección. Se almacenaron los sobrenadantes a temperatura reducida (por ejemplo, -80 °C) hasta su purificación.

45 La información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293 se da en: Meissner, P. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

50 **Ejemplo 7**

Purificación de anticuerpos recombinantes anti-tau(pS422) humana

55 Se filtraron los sobrenadantes de cultivo que contenían anticuerpos y se purificaron mediante dos etapas cromatográficas.

60 Se capturaron los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad usando HiTrap MabSelectSuRe (GE Healthcare) equilibrada con PBS (KH₂PO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), pH 7,4. Se retiraron las proteínas no unidas mediante lavado con tampón de equilibrado, y se recuperó el anticuerpo con tampón de citrato 25 M, pH 3,1, que inmediatamente después de la elución se ajustó a pH 6,0 con Tris-base 1 M, pH 9,0.

65 Se usó cromatografía de exclusión por tamaño en Superdex 200™ (GE Healthcare) como segunda etapa de purificación. La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo en tampón de histidina 20 mM, NaCl 0,14 M, pH 6,0. Las soluciones que contenían anticuerpos se concentraron con una unidad de filtro centrífugo Ultrafree-CL equipada con una membrana Biomax-SK (Millipore, Billerica, MA) y se conservaron a -80 °C.

Ejemplo 8

Cribado cinético

El cribado cinético se realizó de acuerdo con Schraeml *et al.* (Schraeml, M. y M. Biehl, *Methods Mol. Biol.* 901 (2012) 171-181) en un instrumento BIAcore 4000, montado con un sensor BIAcore CM5. El instrumento BIAcore 4000 estaba bajo el control de la versión V1.1 del programa informático. Se montó un chip BIAcore CM5 serie S en el instrumento y se dirigió hidrodinámicamente y se preacondicionó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón del instrumento era un tampón de HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v)). Se preparó un sistema de captura de anticuerpos en la superficie del sensor. Se inmovilizó un anticuerpo policlonal anti-humano caprino con especificidad de Fc de IgG humana (Jackson Lab.) a 30 µg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 5) en los puntos 1, 2, 4 y 5 en las cubetas de lectura del instrumento 1, 2, 3 y 4 a 10.000 RU usando química de NHS/EDC. En cada cubeta de lectura, se capturaron los anticuerpos en el punto 1 y el punto 5. El punto 2 y el punto 4 se usaron como puntos de referencia. Se desactivó el sensor con una solución de etanolamina 1 M. Se aplicaron derivados de anticuerpos humanizados a concentraciones entre 44 nM y 70 nM en tampón del instrumento complementado con 1 mg/ml de CMD (carboximetildextrano). Se inyectaron los anticuerpos durante 2 min a un caudal de 30 µl/min. Se midió el nivel de captura (CL) de los anticuerpos presentados en la superficie en unidades de respuesta rel. (RU). Se inyectaron los analitos en solución, la proteína tau humana fosforilada, la proteína tau humana no fosforilada y la proteína tau humana fosforilada con la mutación T422S, a 300 nM durante 3 min, a un caudal de 30 µl/min. Se supervisó la disociación durante 5 min. Se regeneró el sistema de captura mediante una inyección de 1 min de tampón de glicina 10 mM pH 1,7 a 30 µl/min sobre todas las cubetas de lectura. Se usaron dos puntos de informe, la señal registrada poco antes del final de la inyección de analito, indicada como unión tardía (BL), y la señal registrada poco antes del final del tiempo de disociación, estabilidad tardía (SL), para caracterizar el rendimiento del cribado cinético. Además, se calculó la constante de disociación k_d (1/s) de acuerdo con un modelo de Langmuir y se calculó la semivida del complejo anticuerpo/antígeno en minutos de acuerdo con la fórmula $\ln(2)/(60 \cdot k_d)$. Se calculó la proporción molar (MR) de acuerdo con la fórmula $MR = (\text{Unión tardía (UR)}) / (\text{Nivel de captura (UR)}) \cdot (\text{PM(anticuerpo)} / \text{PM(antígeno)})$. En caso de que el sensor se hubiera configurado con una cantidad adecuada de nivel de captura de ligando del anticuerpo, cada anticuerpo se debería poder unir funcionalmente al menos a un analito en solución, que está representado por una proporción molar de $RM = 1,0$. Entonces, la proporción molar también es un indicador del modo de valencia de la unión del analito. La valencia máxima puede ser $MR = 2$ para un anticuerpo que se une dos analitos, uno con cada valencia de Fab.

En otro modo de realización, las velocidades cinéticas se determinaron a 25 °C y 37 °C usando la misma configuración experimental, pero usando series de concentraciones múltiples de cada analito en solución a 0 nM (tampón), 1,2 nM, 3,7 nM, 11,1 nM, 33,3 nM, 100 nM y 300 nM. A partir del comportamiento de unión dependiente de la concentración, se calcularon los datos cinéticos usando el programa informático de evaluación BIAcore de acuerdo con las instrucciones del fabricante y un modelo de Langmuir 1.1 con RMAX global.

Ejemplo 9**ELISA**

Se añadió péptido/proteína/agregado no biotilado a las placas Maxisorb no recubiertas, se añadió péptido/proteína/agregado biotilado en PBS a las placas Maxisorb recubiertas con estreptavidina, y las placas se incubaron durante la noche. Se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos tres veces con 90 µl de tampón de lavado (PBS 1x/Tween 20 al 0,1 %). Se bloquearon los puntos reactivos remanentes con tampón de bloqueo (PBS 1x/BSA al 2 % (fracción V de seroalbúmina bovina, sin ácidos grasos, Roche, n.º de cat.: 10735078001)/Tween 20 al 0,05 %) mediante incubación durante 1 h. Se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos tres veces con 90 µl de tampón de lavado. Se prepararon las muestras y el anticuerpo de control en 12 diluciones (1:2) en tampón de ELISA (PBS 1x/BSA al 0,5 % (fracción V de seroalbúmina bovina, sin ácidos grasos, Roche, n.º de cat.: 10735078001)/Tween 20 al 0,05 %) con una concentración inicial de 500 ng/ml. El tiempo de incubación fue de 60 minutos a t.a. en un agitador. Se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos tres veces con 90 µl de tampón de lavado. Se prepararon soluciones del anticuerpo secundario en tampón de ELISA. Se transfirió un total de 25 µl de mezcla de anticuerpos a todos los pocillos de la placa de ensayo y, después de esto, se incubó la placa en un agitador durante 60 minutos a t.a. Se desechó el sobrenadante y se lavaron los pocillos tres veces con 90 µl de tampón de lavado. Se añadieron 25 µl de solución ABTS a todos los pocillos. La absorbancia se leyó a 405 nm hasta 492 nm.

Ejemplo 10**Medición cinética de la unión del péptido ptau a los anticuerpos anti-ptau (ensayo de captura)**

Se investigó la unión del fragmento ptau a anticuerpos anti-ptau mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare). Alrededor de 10.000 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (10 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Fc humano; Jackson Immuno Research; código de pedido: JIR 109-005-098) se acoplaron en un chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare. Como tampón de migración, se usó HBS-N pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, GE Healthcare). Para la medición de las muestras, el tampón de migración y de dilución fue PBS-T (solución

salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %), pH 7,4. El bloque de muestra se fijó a 12 °C. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y se purgó dos veces con tampón de migración.

El anticuerpo anti-ptau se capturó inyectando 10 µg/ml de solución durante 300 s a un caudal de 10 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección del fragmento de ptau en diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con 300 nM en diluciones seriadas 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 300 segundos y se activó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró en 60 s de lavado con una solución de ácido fosfórico al 0,85 % seguido de 60 s de lavado con solución de hidróxido de sodio 5 mM a un caudal de 10 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anticuerpo caprino de anti-Fc humano. También se restaron las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de KD y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Ejemplo 11

Medición cinética de los fragmentos Fab de anticuerpos anti-ptau que se unen al fragmento ptau (ensayo directo)

Se investigó la unión de muestras del fragmento Fab de anticuerpos anti-ptau al fragmento ptau mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE T200 (GE Healthcare). Aproximadamente 20 unidades de resonancia (UR) de fragmento ptau biotinilado (0,2 µg/ml; ptau(416-430) [Bi-XUUUU-416;pSer-422]amida) se acopló en un chip SA serie S (GE Healthcare BR-1005-31). El tampón de migración y dilución para la inmovilización fue HBS-N, pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, GE Healthcare). Para la siguiente caracterización cinética, el tampón de migración y dilución fue PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. El bloque de muestra se fijó a 12 °C. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y se purgó dos veces con tampón de migración.

Se midió la asociación mediante inyección de las muestras de fragmento Fab del anticuerpo anti-ptau a diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, partiendo de 100 nM en diluciones 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 600 segundos y se activó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante lavado durante 60 s con una inyección de solución de glicina 10 mM (pH 1,7) a un caudal de 10 µl/min. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron sustrayendo la respuesta obtenida a partir de una superficie de blanco. También se restaron las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de KD y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Ejemplo 12

Medición cinética de fragmentos Fab de anticuerpos anti-ptau que se unen a ptau de longitud completa (ensayo directo)

Se investigó la unión de muestras del fragmento Fab de anticuerpos anti-ptau a la proteína ptau de longitud completa mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE T200 (GE Healthcare). Aproximadamente 200 unidades de resonancia (UR) de proteína ptau biotinilada (2 µg/ml) se acopló en un chip SA serie S (GE Healthcare BR-1005-31). El tampón de migración y dilución para la inmovilización fue HBS-N, pH 7,4 (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, GE Healthcare). Para la siguiente caracterización cinética, el tampón de migración y dilución fue PBS-T (solución salina tamponada con fosfato 10 mM que incluía Tween20 al 0,05 %) a pH 7,4. El bloque de muestra se fijó a 12 °C. La cubeta de lectura se fijó a 25 °C y se purgó dos veces con tampón de migración.

Se midió la asociación mediante inyección de las muestras de fragmento Fab del anticuerpo anti-ptau a diversas concentraciones en solución durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, partiendo de 300 nM en diluciones 1:3. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 600 segundos y se activó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante lavado durante 60 s con una inyección de solución de glicina 10 mM (pH 1,7) a un caudal de 10 µl/min. Las diferencias en el índice de refracción aparente se corrigieron sustrayendo la respuesta obtenida a partir de una superficie de blanco.

También se restaron las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de KD y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Ejemplo 13

Efecto del anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL31A1) y el anticuerpo anti-tau(pS422) (VH35H5/VL49G1) sobre la taupatía en ratones que sobreexpresan tau humana

Se trataron ratones transgénicos TauPS2APP que sobreexpresaban la isoforma de tau humana más larga (Grüninger *et al.*, Neurobiol. Dis. 37 (2010) 294) con anticuerpo 1 (VH35H5/VL31A1), anticuerpo 2 (VH35H5/VL49G1) o bien

vehículo durante un período de 16 semanas. Justo antes del tratamiento, se inmunosuprimió a todos los ratones mediante la administración de una dosis única de un anticuerpo anti-CD4 (0,5 mg/ratón). Posteriormente, los ratones recibieron inyecciones i.p. semanales del anticuerpo o vehículo respectivo a partir de los 9 meses de edad. Para cada uno de los dos anticuerpos, se sometieron a prueba tres dosis separadas, a saber, 1,7 mg/kg, 5 mg/kg y 15 mg/kg. Se sacrificó a los ratones 4-6 días después de la última inyección, se les perfundió transcárdiacamente y se extrajeron los cerebros para su análisis. Se sacrificó a un grupo de ratones no tratados (9 meses de edad) al comienzo del experimento y se usó como comparador de referencia.

Se seccionó sagitalmente cada cerebro y se ultracongelaron los hemisferios individuales sobre nieve carbónica. El hemisferio izquierdo se usó para la cuantificación bioquímica de tau, tau(pS422) y agregados de tau por inmunoanálisis. El hemisferio cerebral derecho se usó para el análisis inmunohistoquímico cuantitativo de tau neurofibrilar que contiene tau(pS422).

Procedimientos

Preparación de homogeneizados cerebrales

Se pesó un hemisferio cerebral de cada ratón y se añadió a 10 volúmenes de tampón de extracción enfriado con hielo (Tris-HCl 25 mM, NaCl 800 mM, sacarosa al 10 %, EGTA 1 mM, pH 7,5, complementado con cóctel de inhibidor de la proteasa al 1 % (Calbiochem n.º 539134) y cóctel de inhibidor de la fosfatasa al 1 % (Sigma n.º P0044)). El tejido se homogeneizó a continuación en un homogeneizador de vidrio Dounce de 2 ml. Se centrifugó el homogeneizado a 20.000 x g durante 20 min a 4 °C. Se desechó el material sedimentado, se dividió el homogeneizado en alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Cuantificación por AlphaLISA de tau y tau(pS422) en homogeneizados cerebrales

Se compraron de Perkin Elmer microesferas donantes recubiertas con estreptavidina AlphaLISA® y aceptadoras no conjugadas. Se acoplaron las microesferas aceptadoras a anticuerpo anti-tau o bien a anticuerpo anti-tau(pS422).

Se biotiniló el anticuerpo anti-tau 5A6 (DSHB) en grupos de amina primaria usando biotina-N-hidroxisuccinamida (Thermo Fischer).

Se realizó la medición de tau en tampón de ensayo HiBlock 1x (Perkin Elmer) usando anticuerpo biotinilado-5A6, microesferas donantes de estreptavidina y microesferas aceptadoras de anticuerpo anti-tau.

Se realizó la medición de tau(pS422) en el tampón de ensayo B (Hepes 25 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,5 %, TopBlock al 0,1 % (LuBioscience), 1 mg/ml de dextrano 500, reactivo de bloqueo 1/10 (Roche)) usando anticuerpo biotinilado-5A6, microesferas donantes de estreptavidina y microesferas aceptadoras de anticuerpo anti-tau(pS422).

Se prepararon muestras para el ensayo en ½ AreaPlate-96 (Perkin Elmer) mezclando 5 µl de patrón o muestra con 10 µl de anticuerpo biotinilado-5A6 y 10 µl de microesferas aceptadoras acopladas a anticuerpo y a continuación incubando durante 1 h a t.a. con agitación. La mezcla se complementó a continuación con 25 µl de microesferas donantes de estreptavidina y se incubó durante otros 30 min a t.a. en la oscuridad con agitación. A continuación, se midieron las placas en un lector de placas de microvaloración Envision (Perkin Elmer) usando excitación láser a 680 nm y un filtro de emisión a 615 nm. Se generaron curvas de calibración usando tau humana recombinante (isoforma más larga) y tau fosforilada con ERK.

Análisis inmunohistoquímico cuantitativo de la patología por ptau

Se prepararon criosecciones sagitales (grosor 10 µm) en un criostato y se tiñeron por inmunofluorescencia cuatro secciones por animal con un anticuerpo contra tau(S422) conjugado con anticuerpo caprino anti-ratón/AlexaFluor555 a una concentración de 10 µg/ml.

Se realizó la adquisición de imágenes de secciones cerebrales enteras con un sistema de escaneo de portaobjetos Metafer 4 (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Alemania). El área inmunopositiva de tau(pS422) se midió dentro del hipocampo y la región neocortical y el área de señal de inmunofluorescencia de ptau positiva determinada por un procedimiento morfométrico sin sesgo por medio de un análisis de imágenes asistido por ordenador. Se realizó la cuantificación del área de ptau positiva con el programa informático de análisis de imágenes Definiens (Definiens AG, Múnich, Alemania).

Resultados

El tratamiento de ratones TauPS2APP con anticuerpo 1 o bien anticuerpo 2 dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de la acumulación de tau(pS422) en los homogeneizados cerebrales (figura 7). Usando el anticuerpo 1 (VH35H5/VL31AS1), la reducción fue estadísticamente significativa a 15 mg/kg. Para el anticuerpo 2 (VH35H5/VL49G1) se acumuló significativamente menos tau(pS422) en todos los grupos de dosis. El nivel general de

tau no cambió en ninguno de los grupos de dosis para ambos anticuerpos (figura 8). Se realizó un análisis inmunohistoquímico cuantitativo para detectar agregados neurofibrilares que contienen tau(pS422) en los cerebros de ratones con anticuerpo 1 (figura 9). Aunque no hubo una disminución estadísticamente significativa de la taupatía en ningún grupo de dosis, se observó una tendencia a menos taupatía con el aumento de la dosis. Esto fue más evidente en la región cortical de los cerebros.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Anticuerpos anti-tau(pS422) humanizados y procedimientos de uso

<130> P32939

<150> EP15173511.5

10 <151> 24/06/2015

<160> 87

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro

ES 2 809 728 T3

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

5 <210> 2
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (422)..(422)
 <223> X=fosfoserina

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 809 728 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Asp Met Val Asp Xaa Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 420 | | 425 | | 430 | | | | | | | | | |
| | Ser | Ala | Ser | Leu | Ala | Lys | Gln | Gly | Leu | | | | | | |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | | | |
| | <210> | 3 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Homo sapiens | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | |
| | <221> | MISC_FEATURE | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <222> | (7)..(7) | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | X=fosfoserina | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 3 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ser | Ile | Asp | Met | Val | Asp | Xaa | Pro | Gln | Leu | Ala | Thr | Leu | Ala | Asp |
| 15 | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| | <210> | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 12 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <213> | Oryctolagus cuniculus | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | Gln | Ser | Ser | Gln | Ser | Val | Arg | Thr | Asn | Lys | Leu | Ala | | | |
| 25 | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | |
| | <210> | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 7 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <213> | Oryctolagus cuniculus | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 5 | | | | | | | | | | | | | |
| | Ser | Ala | Ser | Thr | Leu | Asp | Phe | | | | | | | | |
| 35 | 1 | | | | 5 | | | | | | | | | | |
| | <210> | 6 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 13 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Oryctolagus cuniculus | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <400> | 6 | | | | | | | | | | | | | |
| | Leu | Gly | Tyr | Phe | Asp | Cys | Ser | Ile | Ala | Asp | Cys | Val | Ala | | |
| 45 | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | |
| | <210> | 7 | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 112 | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Oryctolagus cuniculus | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | <400> | 7 | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 809 728 T3

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

Ser Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn
 20 25 30

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Ala Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
 65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
 85 90 95

Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 8
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 8

Ser Asn Ala Ile Asn
 1 5

<210> 9
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 9

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 25 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 10

Ser Asn Ile
 1

<210> 11
 <211> 108
 <212> PRT
 30 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 11

ES 2 809 728 T3

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
 20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Lys Ser Asn
 85 90 95

Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
 100 105

5 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 12

Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 13

Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Arg Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 14

Ser Ala Ser Thr Leu Asp Tyr
 1 5

ES 2 809 728 T3

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia humanizada

 10 <400> 15
Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser Ala Asp Ile Val Ala
1 5 10

 <210> 16
 15 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> secuencia humanizada

 <400> 16
Ala Gln Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
 25
 <210> 17
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> secuencia humanizada

 <400> 17
 35

ES 2 809 728 T3

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
 85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 18

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

15 <210> 19
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 19

ES 2 809 728 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 20
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> secuencia humanizada

<400> 20

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Ile Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15

ES 2 809 728 T3

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 21
 10
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Ile Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

 15
 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20
 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 22

Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

 25
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30
 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 23

Ser Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

 35
 <210> 24
 <211> 13

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> secuencia humanizada

 <400> 24

Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser Ile Ala Asp Ser Val Ala
1 5 10
 10
 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> secuencia humanizada

 <400> 25
 20
Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser Ile Ala Asp Arg Val Ala
1 5 10

 <210> 26
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia humanizada
 30
 <400> 26

Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Ala Asp Pro Val Ala
1 5 10
 35
 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia humanizada

 <400> 27

Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser Ile Ala Asp Ile Val Ala
1 5 10
 45
 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> secuencia humanizada

 <400> 28
 55
Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ala Asp Pro Ile Ala
1 5 10
 60
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

5 <400> 29

Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ala Asp Pro Val Ala
1 5 10

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Val Arg Thr Asn Lys Leu Ala
1 5 10

20 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 31

30 **Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys Leu Ala**
1 5 10

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

40 <400> 32

ES 2 809 728 T3

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
 85 90 95

Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia humanizada

10

<400> 33

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

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

Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
 85 90 95

Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

15

<210> 34

ES 2 809 728 T3

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 34

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
 85 90 95

10 Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

20 <400> 35

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

ES 2 809 728 T3

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

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

5 <210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia humanizada
<400> 36

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

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

15 <210> 37
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> secuencia humanizada
<400> 37

ES 2 809 728 T3

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
85 90 95

Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> secuencia humanizada

<400> 38

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser
85 90 95

Ile Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15

ES 2 809 728 T3

<210> 39
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 39

10

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser
 85 90 95

Ala Asp Pro Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> secuencia humanizada

20

<400> 40

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

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

ES 2 809 728 T3

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
 85 90 95

Ile Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 41
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 41

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
 85 90 95

Ile Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

ES 2 809 728 T3

<400> 42

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser
85 90 95

Ile Ala Asp Pro Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

- 5 <210> 43
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> secuencia humanizada

<400> 43

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

- 15 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser
85 90 95

Ala Asp Pro Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

ES 2 809 728 T3

<210> 44
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia humanizada
 10 <400> 44
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn
 20 25 30
 Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser
 85 90 95
 Ala Asp Pro Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 15 <210> 45
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia humanizada
 <400> 45
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn
 25 20 25 30

ES 2 809 728 T3

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser
 85 90 95

Ala Asp Pro Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 46
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 46

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
 20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

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

Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 47
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

ES 2 809 728 T3

<400> 47

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

5

<210> 48
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> secuencia humanizada

<400> 48

15

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

ES 2 809 728 T3

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

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

Ser Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 51

5 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia humanizada

<400> 51

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
 20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

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

Ser Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

15 <210> 52

<211> 110

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

ES 2 809 728 T3

<220>

<223> secuencia humanizada

<400> 52

5

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia humanizada

<400> 53

15

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

ES 2 809 728 T3

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 56
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia humanizada

<400> 56

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 57
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 809 728 T3

<220>

<223> secuencia humanizada

<400> 57

5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 58

<211> 330

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

15

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

ES 2 809 728 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

ES 2 809 728 T3

<210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 59

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10 <210> 60
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 60

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80

ES 2 809 728 T3

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

5 <210> 61
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> rbHCfinal.up
 <400> 61

aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc **37**

15 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> rbHCfinal.do
 <400> 62

25 **ccattggtga ggggtgcccg a g** **21**

30 <210> 63
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> rbLCfinal.up

35 <400> 63

aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc **34**

40 <210> 64
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> rbLCfinal.do
 <400> 64

50 **cagagtrctg ctgaggttgt aggtac** **26**

<210> 65
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> secuencia humanizada

60 <400> 65

ES 2 809 728 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 66
<211> 111
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> secuencia humanizada

<400> 66

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 67

ES 2 809 728 T3

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia humanizada

<400> 67

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
 85 90 95

10 Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 68
 <211> 111
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia humanizada

20 <400> 68

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu

ES 2 809 728 T3

35

40

45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Pro
85 90 95

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

<210> 69
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia humanizada

<400> 69

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Pro His
85 90 95

Gln Asp Val Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1

<400> 70

Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Asn Asn Lys Leu Ala
1 5 10

5 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> HVR-L1

<400> 71

Arg Ser Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Lys Leu Ala
1 5 10

15 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> HVR-L2

25 <400> 72

Ser Ala Ser Asp Leu Asp Tyr
1 5

30 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> HVR-L2

<400> 73

Ser Ala Ser Asn Leu Asp Tyr
1 5

40 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> HVR-L3

<400> 74

50 **Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Pro Leu Asp Ile Val Ala**
1 5 10

55 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> HVR-L3

<400> 75

ES 2 809 728 T3

Ala Gly Tyr Phe Asp Pro His Gln Asp Val Val Ala
 1 5 10

<210> 76
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> dominio variable de la cadena pesada

10 <400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Ser
 20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Ser Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

15 <210> 77
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> HVR-H1

<400> 77

25 Asn Ser Ala Ile Asn
 1 5

<210> 78
 <211> 111
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL35G4

35 <400> 78

ES 2 809 728 T3

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Phe Glu Ala Pro
 85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 79
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> HVR-L3
 <400> 79

Ala Gly Tyr Phe Glu Ala Pro Ala Asp Ile Val Ala
 1 5 10

15 <210> 80
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> VL145B12
 <400> 80

ES 2 809 728 T3

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Ser
85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 81
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L2

<400> 81

Ala Ala Ser Asn Leu Asp Phe
1 5

15 <210> 82
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> variante_DANG de humanización de VH 299-009

<400> 82

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

25 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

ES 2 809 728 T3

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 124
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> variante_DASG de humanización de VH 299-009
<400> 83

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

ES 2 809 728 T3

115 120

<210> 84
 <211> 124
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante_DAQG de humanización de VH 299-009

10 <400> 84

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

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 85
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> variante_NYA de humanización de VL 299-009

<400> 85

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

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

ES 2 809 728 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 86
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL4G1

<400> 86

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

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

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Pro
 85 90 95

Ala Asp Ile Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VL4G1-HVR-L3

<400> 87

Leu Gly Tyr Phe Asp Ser Pro Ala Asp Ile Val Ala
1 5 10

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la tau humana que comprende una Ser fosforilada en la posición 422 (tau(pS422)), en el que el anticuerpo comprende
- 5 en el dominio variable de la cadena pesada (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09, (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y
- 10 en el dominio variable de la cadena ligera
- (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, o
- 15 (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, o
- (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74,
- 20 en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 4, 24 y 78 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de valina,
- en el que el anticuerpo tiene en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 71 (numeración de acuerdo con Kabat) un residuo de arginina.
- 25 2. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
- a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 67, o
- 30 b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66, o
- 35 c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68.
3. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo tiene una función efectora inactiva.
- 40 4. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo
- i) se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, y/o
- 45 ii) no se une a la tau humana de longitud completa (SEQ ID NO: 01) a 1 µg/ml, y/o
- iii) se une específicamente a la tau humana de longitud completa fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02), y/o
- 50 iv) se une específicamente a agregados de la tau humana fosforilada en la serina en la posición 422 (SEQ ID NO: 02).
5. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo tiene un valor de CE50 para
- 55 a) el fragmento de tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 de 6 ng/ml o menos, y/o
- b) la tau(pS422) humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 4,5 ng/ml o menos, y/o
- 60 c) agregados de la tau(pS422) humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02 de 30 ng/ml o menos, y/o
- d) la tau humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01 y que tiene la mutación aminoacídica S422A de 125 ng/ml o menos.
- 65

6. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo se une específicamente a la tau(pS422) humana (SEQ ID NO: 02) y no se une a la tau humana (SEQ ID NO: 01).
7. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es
- 5 a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- 10 c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- 15 e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.
- 20 8. Un anticuerpo biespecífico que comprende
- i) un primer sitio de unión seleccionado de
- 25 a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 66, o
- b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 67, o
- 30 c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 65 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68,
- 35 y
- ii) un segundo sitio de unión seleccionado de
- a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 82 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85, o
- 40 b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85, o
- 45 c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 84 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 85.
9. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.
11. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 55 12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer prodrómica.

Figura 1

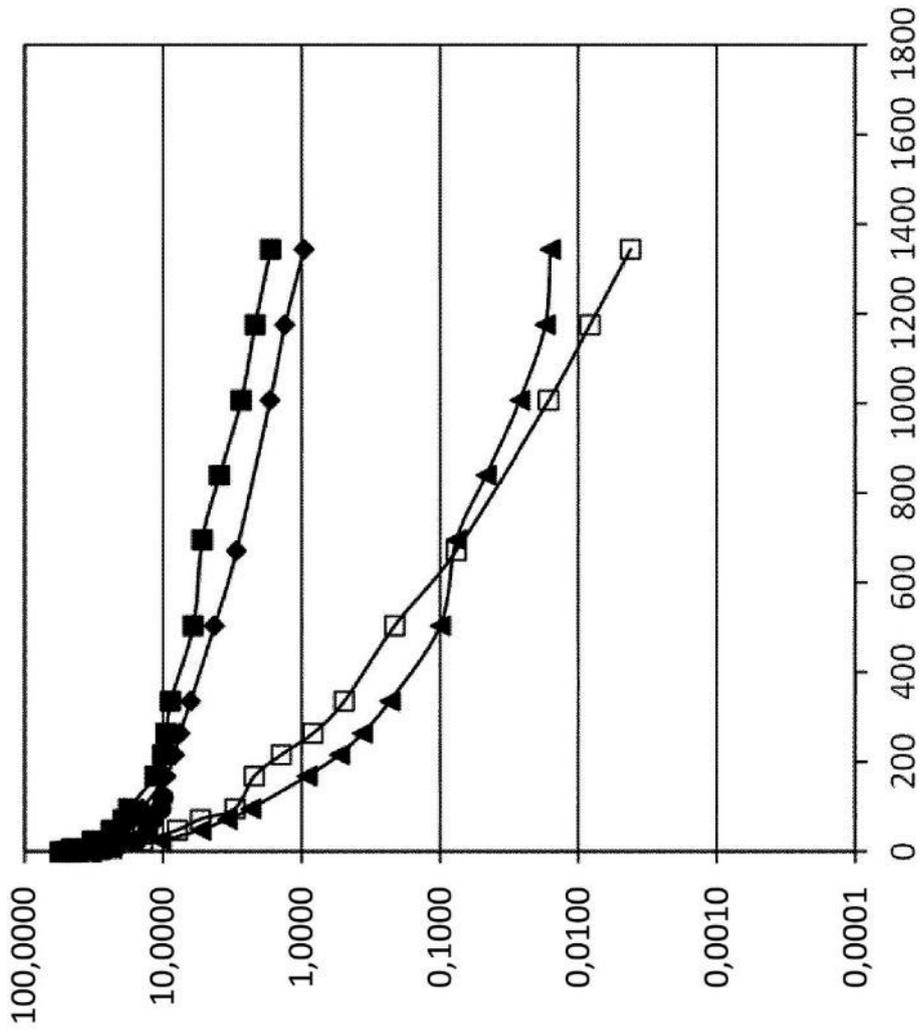


Figura 2

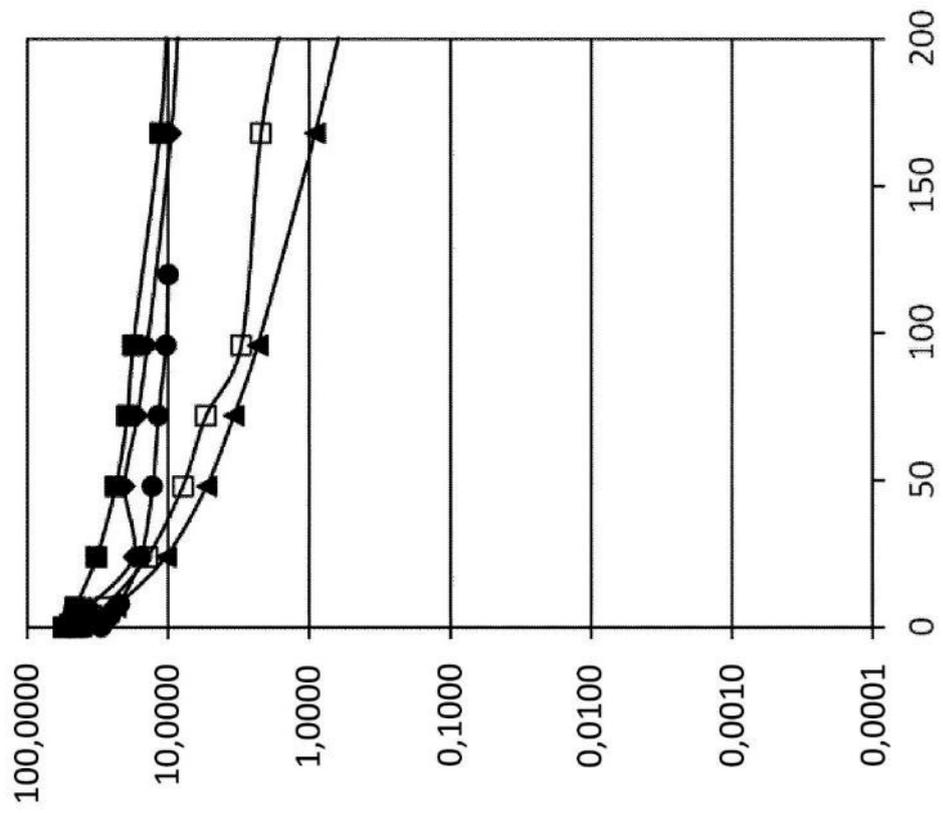


Figura 3

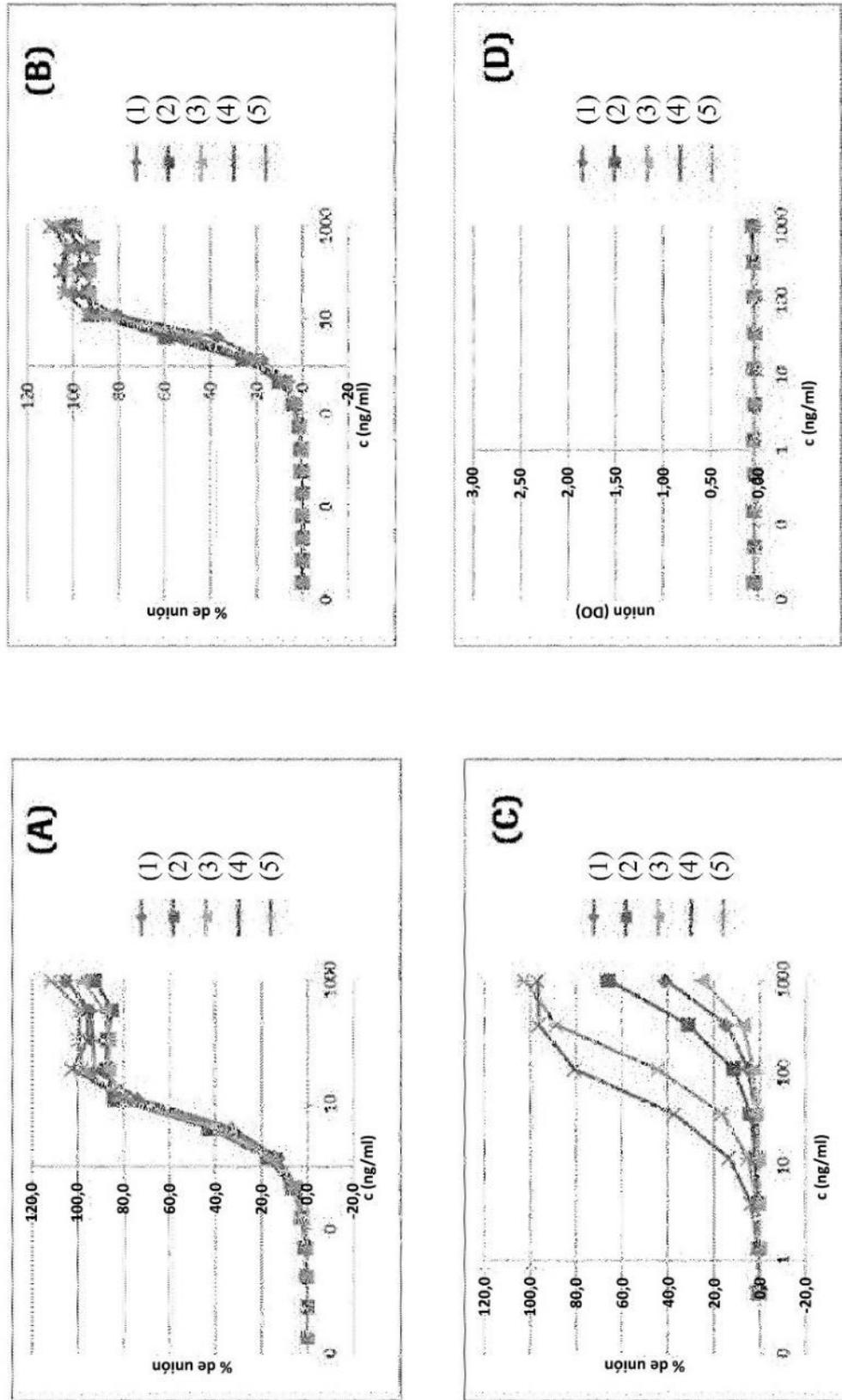


Figura 4

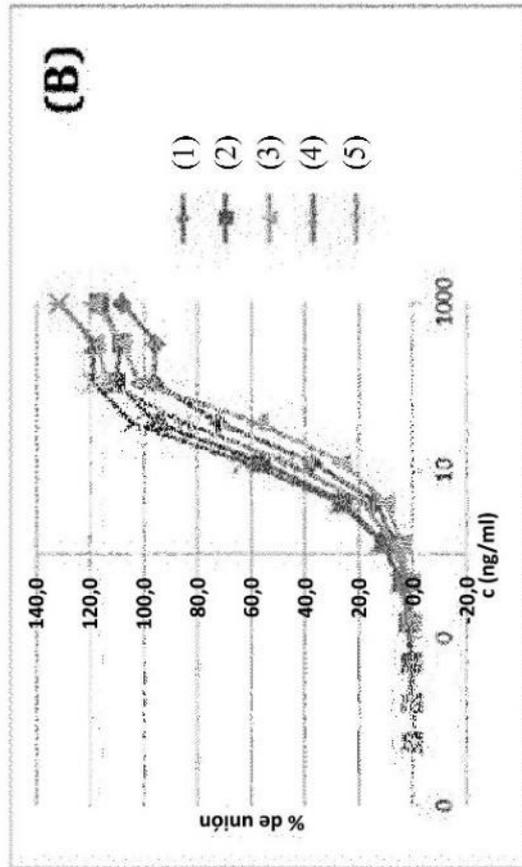
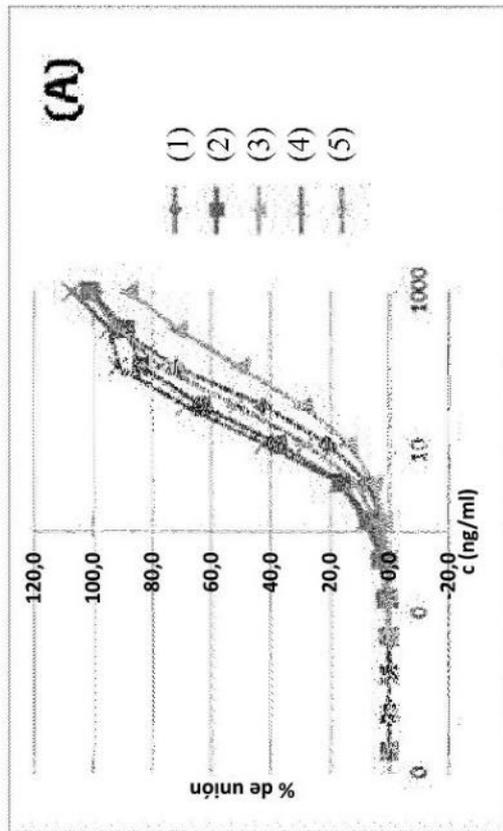
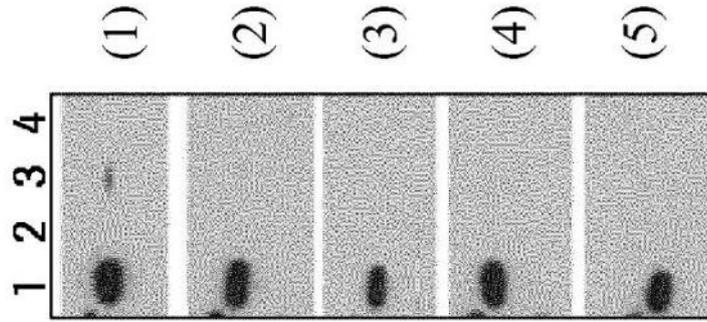


Figura 5



Todos los anticuerpos: 1 ug/ml

Tau recombinante:

1. ptau
2. Tau
3. ptau(S422A)
4. Tau(S422A)

Figura 6

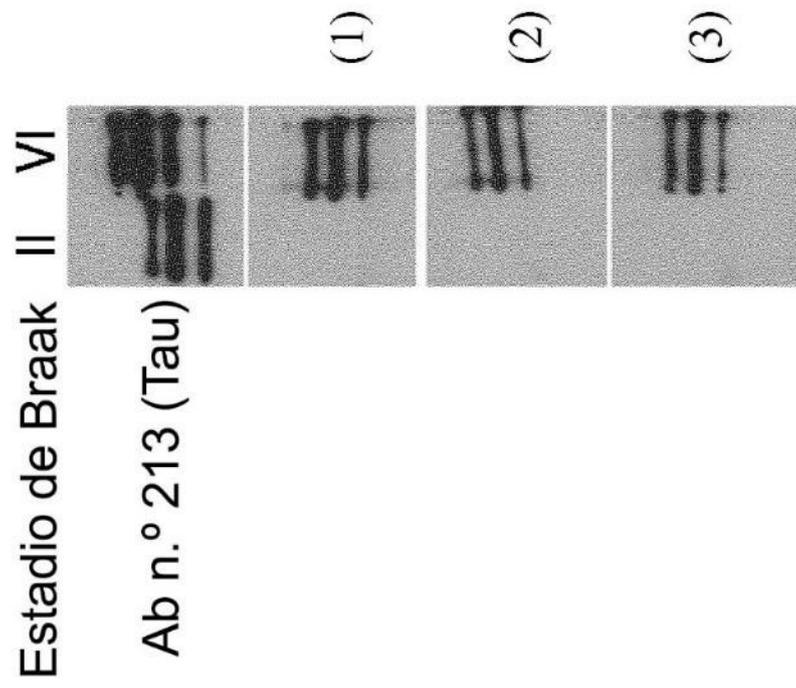
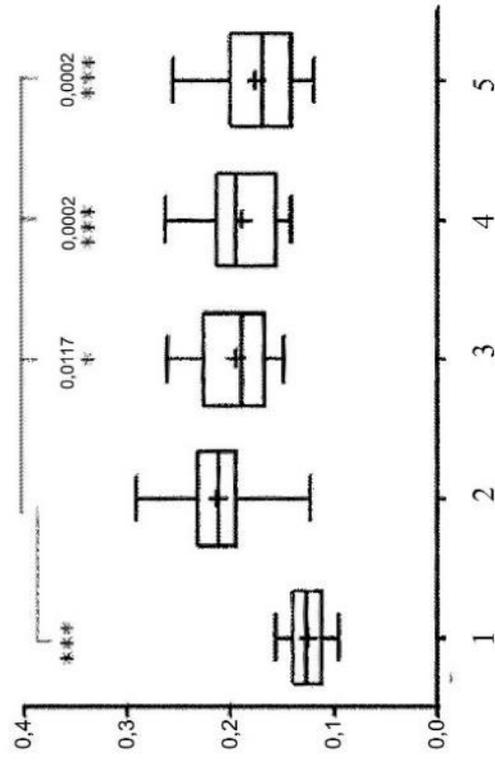


Figura 7

B:



A:

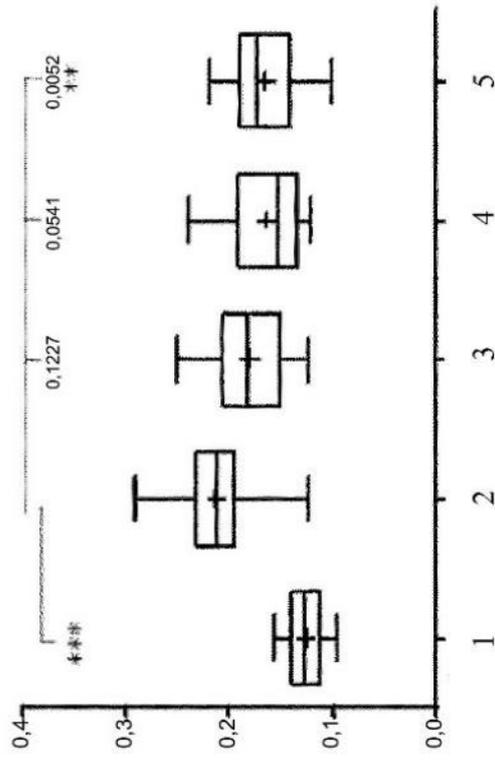
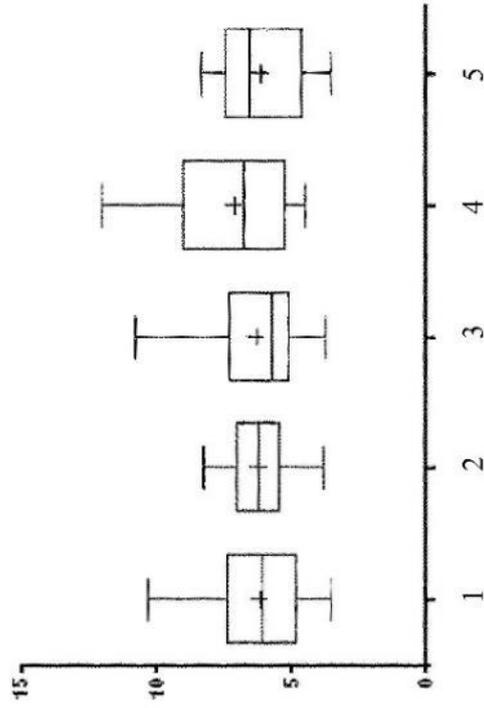


Figura 8

B:



A:

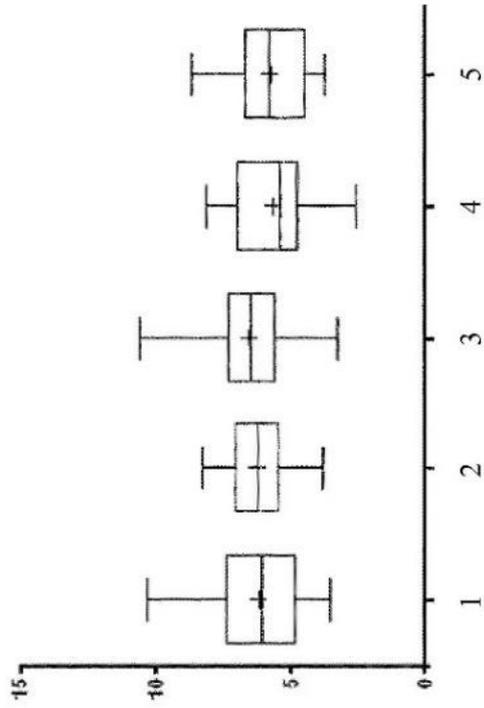
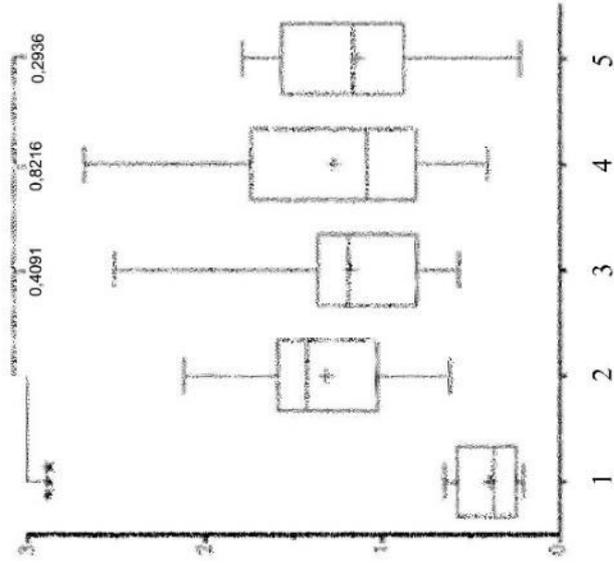


Figura 9

B:



A:

